

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* spp. NA  
TECNOLOGIA DE ABATE DE FRANGOS DE CORTE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Lilian Andriva Dos Santos**

**Passo Fundo, RS, Brasil**

**2014**

# **DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* spp. NA TECNOLOGIA DE ABATE DE FRANGOS DE CORTE**

**Lilian Andriva Dos Santos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação** – Área de concentração em Higiene, inspeção, microbiologia e composição química de alimentos.

**Orientadora: Profa. Luciana Ruschel dos Santos**

**Passo Fundo, RS, Brasil**

**2014**

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO

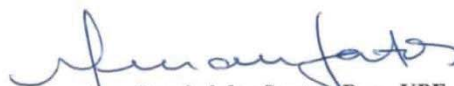
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* spp. NA  
TECNOLOGIA DE ABATE DE FRANGOS DE CORTE


Elaborada por  
**Lilian Andriva dos Santos**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestra em Bioexperimentação**

Comissão Examinadora

  
Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF  
(Orientadora/Presidente)

  
Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF

  
Vladimir Pinheiro do Nascimento, Dr., UFRGS

Passo Fundo, RS, Brasil  
2014

## CIP – Catalogação na Publicação

---

S586p Santos, Lilian Andriva dos  
Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. na  
tecnologia de abate de frangos de corte / Lilian Andriva dos  
Santos. – 2014.  
41 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Luciana Ruschel dos Santos.  
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –  
Universidade de Passo Fundo, 2014.

1. Alimentos – Contaminação. 2. Abate. 3. Salmonela.  
4. Agentes antimicrobianos. I. Santos, Luciana Ruschel dos,  
orientadora. II. Título.

CDU: 663/664

---

Catálogo: Bibliotecária Fernanda Spíndola - CRB 10/2122

### *Agradecimento Especial*

*A Dra. Luciana Ruschel dos Santos, nobre orientadora ou simplesmente querida Lu, que se portou como só fazem os sábios. Acreditou no meu trabalho, na minha capacidade, me proporcionou liberdade na condução da pesquisa, foi por inúmeras vezes minha confidente, minha conselheira, disponibilizou seu tempo para saber sobre minha vida, dividiu comigo as inseguranças e expectativas, acalmou meus medos, conduziu-me a maiores reflexões que ajudaram a transformar ideias em palavras, também trouxe comédia para nossa rotina nos intervalos de laboratório, proporcionou-nos muitas histórias engraçadas. Lu eu acredito que não existem palavras para descrever o que você representa em minha vida, tua amizade é preciosa, obrigada por ter sido essa pessoa tão iluminada. Por ti meu respeito, carinho e admiração.*

*Muito obrigada!*

## *Agradecimentos*

Em primeiro lugar a Deus princípio, meio e fim, e a Nossa Senhora Aparecida que nos momentos de fraqueza sempre foram meu porto seguro e luz no meu caminho. Pela presença constante em minha vida, por tantas oportunidades. Tudo posso Naquele que me fortalece.

Pela dádiva de ter tantas pessoas abençoadas a minha volta, que se revelaram verdadeiros amigos, sem eles certamente não haveria a concretização deste trabalho, vocês enriqueceram meus dias na universidade, vocês me proporcionaram bons momentos, levarei todos juntos na lembrança e no coração.

Às minhas amigas queridas, as “*Lab Girls*” a Mexicana Luana Parizotto, e a Polaquinha Marcieli Marotzki, que tornaram a execução do experimento muito mais divertido, não deixando de lado a seriedade, comprometimento e responsabilidade, aos que assim como as “*Lab girls*”, sempre estiverem prontas e dispostas para as minhas coletas, Márcia Bortoluzzi, Maiara Gazola, Mirian Provin, Bruna Superti, e o guerreiro Luís Pedrotti. Devo destacar em especial a minha amiga queridona, Ligiani Mion, minha Mestre no laboratório. Ligi obrigada por todo conhecimento repassado, pelo teu jeito meigo de ser, pelo humor ácido de vez em quando, o que também me divertia muito, pelo tempo destinado ao meu experimento, pelas palavras de encorajamento, pelas técnicas que me ensinou a praticar, por tudo, tudo, tudo em triplicata. Todos vocês tenham certeza de uma coisa, sem vocês nada disso teria se concretizado, meu muitíssimo obrigada de coração.

A todas as funcionárias, estagiárias e bolsistas dos laboratórios de Bacteriologia e Virologia em especial Ilena Bueno, Eloisa Bay e Lucí Rech, que auxiliaram a execução do experimento, pelo simples fato de muitas vezes lembrar-se da autoclave quando na verdade os tubos de meio já haviam sido retirado e já estavam fechadinhos esfriando para serem guardados, por simplesmente deixarmos vidrarias a serem esterilizadas e não ter a preocupação de quando colocar, pois tinha quem cuidava disso, o que facilitava muito.

Às minhas colegas de curso Carla Ferreira, Tatiana Pavan, Monique Lorenson, Juliana Gottlieb, Pamela Cemim, Valéria Hartmann e o colega Ricardo Pimentel, obrigada pelos bons momentos que passamos juntos, pela amizade, pelo companheirismo na hora da aula e na hora da festa, por não ter havido concorrência nem competição entre nós, por a amizade ter prevalecido e por fazerem parte deste grupo. Orgulhem-nos, pois o nosso grupo, os nossos nomes ficarão marcado na história do nosso Programa como sendo a primeira turma do PPG-Bioexperimentação, e certamente todos os nossos professores terão boas lembranças da nossa turma.

À amiga Daniela Avila Bohrz, colega desde a primeira turma que se fez presente junto conosco em muitos momentos alegres no decurso dos semestres, que puxou a frente para a publicação de artigos, que nos acolheu em Gramado durante o

congresso de Higienistas de Alimentos, que foi companheira nos intervalos, obrigada pela amizade.

A toda equipe do Centro de Pesquisas em Alimentos – CEPA, que permitiu nossa permanência para realização de observação dos procedimentos internos do laboratório, em especial Sonia de Lima, Magali Fetter e Isabel Cisco, pela amizade e disposição em compartilhar conosco conhecimento e aprendizado, vocês foram fundamentais.

A todos os professores Doutores que compõe o seletor grupo de docentes do programa PPG-Bioexperimentação: Luciana Ruschel, Hélio Rocha, Luiz Carlos Gutkosky, Maria Isabel Botelho, Eraldo Zanella, Adriana Costa, Elci Dickel por ter sido um amigo tão estimado e querido e por ter nos proporcionado aulas tão prazerosas, Laura Beatriz Rodrigues pela amizade, por ter autorizado a permanência no Cepa e pela prontidão para ajudar no enriquecimento deste trabalho, Rafael Frandoloso pela disponibilidade nos empréstimos de materiais para execução do experimento sempre se colocando a disposição ao que precisássemos, Leonardo Barcellos pelo forte enfoque na importância da pesquisa científica, e por último, porém não menos importante nosso estimado Coordenador Luiz Carlos Kreutz que sempre esteve pronto a ouvir nossas necessidades, que nos pediu sugestões de como deveria ser a nossa sala, que lutou pela nossa turma para que todos fossem contemplados com bolsas de forma igualitária, que como professor representou um bom exemplo de seriedade, determinação, profissionalismo e conduta ética, e suas aulas? Bom estas nem tem o que citar, das aulas de sábado de manhã ficou a saudade, aulas das quais nenhum aluno faltava. A todos vocês minha gratidão pelo conhecimento transmitido.

A minha querida orientadora do curso de especialização em Tecnologia e Controle de Qualidade de Alimento Dra. Luciane Colla, pelo incentivo de seguir em frente, por ter me impulsionado a ir em busca do Mestrado, Lu esse resultado também tem um dedinho teu.

À Universidade de Passo Fundo – UPF e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste sonho, todo o meu respeito e agradecimento.

*Aos mais preciosos da minha vida, aos que Eu mais amo e que sempre estão ao meu lado, que fazem parte do meu alicerce: minha Família, que se fez presente nos bons e maus momentos, por todo o amor, dedicação, paciência, companheirismo e constante incentivo, com toda a minha gratidão, todo o meu amor e todo meu carinho.*

***Dedico...***



*Todo mundo ama um dia  
Todo mundo chora  
Um dia a gente chega  
E no outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua história  
Cada ser em si  
Carrega o dom de ser capaz  
E ser feliz*

*Almir Sater*

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 Salmoneloses em Aves .....	18
2.2 <i>Salmonella</i> na Tecnologia de Abate de Frangos de Corte .....	19
2.3 Métodos de Diagnóstico .....	20
<b>3. CAPÍTULO 1. Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de <i>Salmonella</i> spp. em abatedouros de frangos de corte</b> .....	23
Abstract .....	24
Resumo .....	24
Introdução .....	25
Material e métodos .....	25
Amostragem e pontos de coleta nos abatedouros de frango de corte .....	25
Processamento das amostras .....	26
<i>Swabs</i> de cloaca .....	26
Esponjas de gaiolas de transporte .....	26
Amostras de frango e carcaças .....	26
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. por microbiologia convencional .....	26
Quantificação de <i>Salmonella</i> spp. por Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP) .....	26
Cálculo do Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP) <i>Calculator</i> .....	27
Resultados e discussão .....	27
Conclusões .....	29
Referências .....	30
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	35
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	36
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	38

**LISTA DE ABREVIATURAS**

°C	Grau Celsius
%	Por cento
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
g	Gramma
h	Hora
min	Minutos
ABEF	Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango
AN	Agar Nutriente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APT	Água Peptonada Tamponada
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAM	<i>Bacteriological Analytical Manual</i>
BGN	Agar Verde Brilhante com Novobiocina
BHI	<i>Brain Heart Infusion broth</i> – Caldo de infusão de cérebro coração
BPF	Boas Práticas de Fabricação
cm	centímetro
DTA's	Doenças Transmitidas por Alimentos
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LIA	<i>Lysine Iron Agar</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MC	Microbiologia Convencional
mL	Mililitro
mNMP	Número mais Provável miniaturizado
MSRV	<i>Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis</i> com Novobiocina
NMP	Número mais Provável

OAC	Avaliação de Conformidade Orgânica
PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
RV	Rappaport Vassiliadis
SIF	Serviço Inspeção Federal
SIM	<i>Sulphur Indol Motility</i>
sp.	Espécie
spp.	Espécies
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPF	Universidade de Passo Fundo
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
XLT-4	Xilose Lisina Tergitol – 4

## RESUMO

**Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação  
Universidade de Passo Fundo**

### **DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. NA TECNOLOGIA DE ABATE DE FRANGO DE CORTE.**

Autor: Lilian Andriva dos Santos  
Orientador: Luciana Ruschel dos Santos  
Passo Fundo, 22 de Agosto de 2014

Infecções por *Salmonella* são associadas à criação intensiva das aves e à surtos de salmonelose clínica, visto que as contaminações das carcaças podem ocorrer tanto por contato entre aves saudáveis e infectadas como por contaminação cruzada nos abatedouros, onde o número de bactérias é variável nas diferentes etapas da tecnologia de abate. Análises microbiológicas desde o campo até os produtos finais são fundamentais para estimar a extensão da carga microbiana e avaliar os efeitos dos métodos de controle sanitário utilizados nos frigoríficos, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Crítico de Controle (APPCC). A pesquisa de *Salmonella* spp. para avaliação da contaminação em abatedouros por métodos qualitativos já é realizada, mas a quantificação da bactéria não é rotineiramente empregada, uma vez que técnicas tradicionais de enumeração, como o Número Mais Provável (NMP), que utiliza séries de tubos múltiplos, demandam tempo, pessoal e recursos financeiros elevados, dificultando sua aplicação em programas de monitoria. Métodos de quantificação de bactérias por Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) são citados como uma alternativa mais rápida e menos trabalhosa para enumeração de salmonelas. Assim, os objetivos deste trabalho foram detectar e quantificar *Salmonella* spp. na tecnologia de abate de frangos de corte por microbiologia convencional (MC) e por número mais provável miniaturizado (mNMP). As coletas foram realizadas em três abatedouros sob Inspeção Federal no sul do Brasil e em seis pontos de coleta, em triplicata, definidos como: recepção das aves (*swabs* de cloaca e esponjas de gaiolas de transporte antes e após a higienização) e carcaças (após pré resfriamento em *chiller*, após o gotejamento e antes da embalagem primária, e congeladas a -12°C por 24 horas), totalizando 108 amostras e perfazendo 240 ensaios para detecção e

quantificação de *Salmonella* spp, respectivamente, incluindo os controles negativo (*E. coli* ATCC 25992) e positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076). Identificou-se *Salmonella* spp. em três dos seis pontos do fluxograma de abate e em dois dos três estabelecimentos amostrados, independentemente do método utilizado, perfazendo 5,5% de positividade, onde destaca-se a contaminação nas gaiolas de transporte das aves após a higienização. Não foi possível correlacionar os resultados da microbiologia convencional e do mNMP ou mesmo quantificar a contaminação ao longo da tecnologia de abate, o que indica a necessidade de se utilizar um método qualitativo aliado ao método de quantificação quando *Salmonella* estiver presente em quantidades inferiores ao limite de detecção do mNMP proposto (0,13 NMP/mL). Os sorovares identificados foram Typhimurium, Panama, Lexington e Rissen, considerados paratíficos e, portanto, potencialmente capazes de causar infecções em humanos, embora estes sorovares não tenham sido isolados em produtos finais mas na chegada dos frangos no abatedouro (*swabs* de cloaca e gaiolas de transporte). A identificação de *Salmonella* spp. nas gaiolas de transporte após a higienização é um indicativo da necessidade de revisão e adequação dos métodos automatizados de lavagem atualmente utilizados nos abatedouros.

**Palavras-chave:** *Salmonella* spp.; número mais provável miniaturizado, sorovares, frangos de corte.

**ABSTRACT**  
**Master's Dissertation**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação**  
**Universidade de Passo Fundo**

**DETECTION AND QUANTIFICATION OF *Salmonella* spp.  
IN POULTRY SLAUGHTERHOUSES**

Author: Lilian Andriva dos Santos  
Advisor: Luciana Ruschel dos Santos  
Passo Fundo, 22 de Agosto de 2014

*Salmonella* infections are associated with intensive poultry farming and with outbreaks of clinical salmonellosis. Healthy birds can be contaminated by contact with infected ones or by cross-contamination in abattoirs, where bacterial count varies across different slaughtering processes. Microbiological analyses of samples collected throughout the process (from the broiler farm to the end products) are crucial for estimating microbial load and assessing the effects of control methods used at meat-packing plants, including good manufacturing practices (GMP), sanitation standard operating procedures (SSOP) and hazard analysis and critical control points (HACCP). While contamination of slaughterhouses by *Salmonella* spp. has been qualitatively assessed by several studies, quantitative research about this species has not been conducted on a regular basis. This occurs because conventional enumeration methods, such as the most probable number (MPN), which use multiple tubes, are time-consuming and costly and require workforce, thus precluding their application in control programs. So, the miniaturized most probable number (mMPN) method has been recommended as a quicker and less burdensome alternative for the enumeration of *Salmonella* spp. Therefore, the present study aimed to detect and quantify *Salmonella* spp. in poultry slaughtering procedures using conventional microbiology and mMPN method. Samples were collected in triplicate in three federally-inspected southern Brazilian slaughterhouses and from six collection sites: reception of live birds (cloacal swabs and sponge samples from transport cages before and after sanitation) and carcass processing (after pre-chiller, after dripping, and before primary packaging, frozen at -12°C for 24 h), totaling 108 samples and 240 assays for detection and quantification of *Salmonella* spp, respectively, including negative (*E. coli* ATCC

25992) and positive (*S. Enteritidis* ATCC 13076) controls. *Salmonella* spp. was detected in three out of the six processing stages and in two of the three sampled slaughterhouses, regardless of the method used, with 5.5% of positive samples, including those obtained from transport cages after sanitation. It was not possible to correlate conventional microbiology and mMPN results or to quantify contamination in the slaughtering processing line, indicating that it is necessary to use a qualitative method in conjunction with a quantitative one whenever *Salmonella* is found in lower amounts than the proposed mMPN threshold values (0.13 MPN/mL). The following serovars were identified: Typhimurium, Panama, Lexington and Rissen, which are considered paratyphoid organisms and, therefore have a remarkable zoonotic potential, even though these serovars were not isolated from end products, but at the reception of live birds (cloacal swabs and sponge samples from transport cages). The detection of *Salmonella* spp. in transport cages after sanitation demonstrates the necessity to reassess and adjust the automated washing procedures currently utilized in slaughterhouses.

**Key words:** *Salmonella* spp., miniaturized most probable number, serovars, poultry slaughterhouses.



## 1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda de alimentos, em especial os de origem animal, como ovos e frangos, é um dos fatores do desenvolvimento verificado na avicultura mundial, devido em parte ao ciclo rápido de produção dos animais (21). O desenvolvimento sócio econômico de muitas nações teve como origem a produção de alimentos e, mesmo nos dias atuais, muitos países tem na agricultura o sustentáculo de sua economia (9).

A quantidade de produtos no mercado disponibiliza ao consumidor amplas escolhas. Entretanto, apesar do progresso da medicina, na ciência e tecnologia de produção de alimentos, as enfermidades causadas por patógenos alimentares continuam representando problemas significativos para a saúde e para a economia. O número crescente e a gravidade de doenças transmitidas por alimentos têm aumentado consideravelmente o interesse do público em relação à segurança alimentar e dos órgãos de fiscalização para evitar problemas de saúde pública (11).

A produção industrial e o intercâmbio comercial intenso de animais e de alimentos de origem animal para consumo humano têm favorecido a introdução e a disseminação de patógenos na cadeia alimentar (35). O risco da disseminação das doenças transmitidas por alimentos está vinculado a diversas razões, sejam pela adaptação microbiana, mudanças nos sistemas de produção de alimentos, hábitos alimentares da população, mudanças na criação de animais, processos produtivos e tecnologia de alimentos, globalização no comércio internacional, aumento das populações susceptíveis e demanda dos consumidores (8).

O trato intestinal das aves, principalmente galinhas, é um dos principais reservatórios de microrganismos patogênicos como a *Salmonella* spp., que por meio de inúmeros veículos poderá contaminar matérias-primas e alimentos processados na tecnologia de abate com possibilidade de contaminação no produto final.

Com relação à carne de frango, está demonstrado que mesmo um pequeno número de aves infectadas pode causar a contaminação de toda a linha de abate, multiplicando a possibilidade de ocorrências de infecção alimentar e representando perigos à saúde pública. Assim, em frangos de corte, os atuais métodos de abate e práticas de processamento podem disseminar microrganismos de uma carcaça para outra e o consumo dessa carne, portanto, envolver a ingestão de bactérias potencialmente patogênicas (30). A contaminação microbiana tende a ocorrer como consequência dos

procedimentos empregados na produção industrial. Em cada etapa do processo existem oportunidades para a contaminação da carcaça por microrganismos presentes na planta de abate ou por contaminação cruzada advinda de outras aves e o número de bactérias na superfície da carcaça varia consideravelmente nas diferentes etapas do processo (34).

Existem vários métodos para avaliação microbiológica de produtos cárneos, como amostras de tecido, *swabs*, rinsagem e/ou a combinação de dois ou mais métodos. A amostragem da superfície da carcaça de frango é dificultada pelos próprios procedimentos utilizados durante o abate das aves, como escaldagem e depenagem, com os microrganismos podendo se fixar nos folículos da pele e dificultando sua remoção por métodos como *swab* e lavagem da carcaça. A remoção e maceração da pele são um método eficiente para determinações microbiológicas em carcaças de frango, capaz de recuperar cerca de 90% dos microrganismos, mas tem a desvantagem de destruir a carcaça amostrada, sendo, portanto, desaconselhável em linhas comerciais de abate (14).

Infecções por *Salmonella* são comumente associadas à criação intensiva das aves e à surtos de salmoneloses clínicas, visto que as contaminações podem ocorrer tanto por contato entre aves sadias e infectadas como por contaminação cruzada no abate, sendo que o número de bactérias na superfície das carcaças varia consideravelmente nas diferentes etapas da tecnologia de abate, aumentando e diminuindo constantemente.

A análise microbiológica é fundamental para estimar a extensão da carga microbiana existente na superfície de carcaças e avaliar os efeitos dos métodos de controle sanitário utilizados nos abatedouros, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) para redução desta contaminação inicial. Entretanto, os métodos microbiológicos tradicionais de enumeração de microrganismos, como o Número Mais Provável (NMP), são demorados, dispendiosos e não aplicáveis em uma rotina industrial de monitoria para salmonelas.

Métodos de enumeração por Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) podem representar uma forma rápida, precisa e de baixo custo para a quantificação de microrganismos em comparação com a metodologia tradicional do NMP para quantificação de microrganismos por séries de tubos.

Assim, devido à importância do controle de *Salmonella* spp. na tecnologia de abate e o risco que a bactéria representa para a saúde pública, neste trabalho objetivou-se detectar e quantificar *Salmonella* spp. em diferentes pontos da tecnologia de abate de

frangos de corte utilizando-se a microbiologia convencional e uma metodologia de número mais provável miniaturizado (mNMP).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Salmoneloses em aves

O nome *Salmonella* foi dado após o médico veterinário bacteriologista Daniel E. Salmon, juntamente com Smith, isolarem uma bactéria do intestino de suínos em 1884, que foi denominada de *Salmonella Choleraesuis*. As salmonelas possuem grande similaridade genética e são diferenciadas por sorovares que, atualmente, é o resultado acumulado de vários anos de estudos das interações dos anticorpos com as suas superfícies antigênicas e foram estabelecidos por Kauffman e White há quase um século. Todas as fórmulas antigênicas conhecidas como sorovares de *Salmonella* estão listados no chamado esquema Kauffman-White e, em 2007, foram descritos 2.579 sorotipos (16).

*Salmonella* spp. pertence a família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, catalase positivos, oxidase negativos, redutores de nitratos e nitritos e, geralmente, a maioria das espécies móveis com flagelos peritríquios, exceção de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Fermentam glicose, produzindo ácido e gás, mas são incapazes de metabolizar a lactose e a sacarose. Como não formam esporos, são termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C, por 15 a 20 minutos. O gênero contém mais de 2.500 linhagens diferentes, as quais são denominadas ainda como sorovares ou sorotipos (21). O grupo das Salmonelas é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica*, que é dividida em seis subespécies, e *Salmonella bongori*. Muitos isolados de humanos e animais de sangue quente pertencem a subespécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica*. Outras subespécies de *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* ocorrem normalmente em animais de sangue frio e são de baixa patogenicidade (20).

*Salmonella* spp. localizam-se primordialmente no trato gastrointestinal das aves em geral, de mamíferos domésticos e silvestres, bem como répteis, sem provocar, na maioria das espécies hospedeiras, manifestações de sintomas (14). Dentre as salmoneloses destacam-se os sorovares específicos de aves (*S. Pullorum* e *S.*

Gallinarum), com distribuição mundial, tanto na avicultura industrial como na extensiva, causando perdas financeiras para a indústria avícola com mortalidade de até 100% do lote (29) enquanto as salmoneloses paratíficas causam infecções principalmente em aves jovens, tornando-as adultas portadoras assintomáticas. (25) e são potencialmente capazes de causar intoxicações alimentares em humanos.

## **2.2 *Salmonella* na Tecnologia de Abate de Frangos de Corte**

A microbiota da ave viva se encontra essencialmente na superfície externa, tegumentos cutâneos, no trato digestório e, em menor grau, no trato respiratório. A contaminação se dá inicialmente pela retenção das bactérias sobre a pele, a qual vai permitir que os microrganismos possam se aderir convenientemente. Devido a grande quantidade de nutrientes nas carcaças associada ao desenvolvimento microbiano, a carne pode deteriorar-se em um curto espaço de tempo. O tipo e o número de microrganismos presentes na carne refletem o grau de higiene do abatedouro, como também as condições de armazenamento após o abate dos animais. Assim, plantas de processamento de aves favorecem a sobrevivência e transmissão de bactérias comensais levando à deterioração e, potencialmente, à transmissão de bactérias patogênicas (16).

O principal objetivo do abate de animais domésticos para consumo humano é a obtenção da carne com a menor contaminação possível (32), na maioria das plantas de processamento, após o abate e depenagem dos frangos, as carcaças são evisceradas, lavadas, processadas em conformidade com a comercialização, refrigeradas, embaladas e armazenadas sob refrigeração, mas que o abate e a manipulação das carcaças nos açougues pode aumentar a microbiota contaminante (15).

Pela legislação brasileira (5), *Salmonella* spp. tem que estar ausente em 25g da amostra. Entretanto, existe uma quantidade mínima necessária do microrganismo para a ocorrência de doença em humanos. Esta quantidade, ou dose infectante, pode variar com o sorovar, com o estado de saúde e tolerância de cada indivíduo e ainda em função do sorotipo e da afinidade dos mesmos a determinadas espécies animais (19). Produtos refrigerados em temperatura de 2°C podem conter *Salmonella* spp., uma vez que essas possuem a capacidade de permanecer viáveis em produtos refrigerados e congelados por longos períodos. Devido à sobrevivência de *Salmonella* spp. em baixas temperaturas, existe uma Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual

estabelece normas para rotulagem de produtos crus de carnes de aves, exigindo a obrigatoriedade da presença de recomendações sobre o consumo desses alimentos cozidos, fritos ou assados completamente (6).

A Instrução Normativa n° 70 (3) surgiu em 2003 visando conferir um controle minucioso sobre o processo de abate e atender as exigências de segurança do alimento baseado nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), no Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

O controle na qualidade dos alimentos deve ser efetuado de forma rígida, precisa e confiável e, para tanto, devem ser realizados com métodos que comprovadamente sejam apropriados, e ofereçam os resultados pretendidos (13).

### **2.3 Métodos de Diagnóstico para *Salmonella* spp.**

Analisar amostras de alimentos, para evidenciar se existe a presença de bactérias patogênicas ou não, é uma prática padrão para garantir a segurança e a qualidade do alimento (11). Além disso, a quantidade e os tipos de microrganismos presentes em um determinado alimento refletem as condições sanitárias empregadas para a sua produção, assim como as condições atuais desse alimento (28). A interpretação dos resultados em microbiologia de alimentos é geralmente difícil. Devido ao fato de que os microrganismos estão em um ambiente dinâmico, onde pode ocorrer a multiplicação ou morte, as contagens de células viáveis por meio de plaqueamento podem ser mal conduzidas e o processamento de alimentos pode não apresentar uma boa homogeneidade, sendo difícil obter uma amostra representativa para todo o lote (11).

A detecção dos microrganismos em alimentos pode ocorrer por meios de métodos de cultivo tradicionais, seguidos de caracterização bioquímica, ou por meio de técnicas alternativas (30). Os métodos devem ser confiáveis e certificados, pois detalhes de métodos de detecção podem ser encontrados em várias fontes, mas deve-se sempre consultar a edição mais recente dos protocolos (11). Entre as fontes de protocolos aprovados estão: *Association of Official Analytical Chemists, Bacteriological Analytical Manual* (AOAC, 1992); *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992); *Practical Food Microbiology* (ROBERTS et al., 1995).

O procedimento padrão para detecção de *Salmonella* é baseado principalmente na técnica microbiológica convencional (MC), preconizada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), e pela *Bacteriological Analytical Manual* (BAM). (26). A denominação MC refere-se geralmente a métodos que estão em uso comum, frequentemente envolvendo etapas de homogeneização da amostra, preparação de uma série de diluições, inoculação em placas com ágar específico para formação de colônias e posterior contagem, além de por vezes requererem modificações que podem elevar o tempo da realização do ensaio (11).

Já a quantificação de *Salmonella* spp. em alimentos não é uma prática rotineira. Entretanto, esta informação é desejável nas estratégias de redução de infecção alimentar, tanto na avaliação do risco microbiológico como na avaliação de substâncias e procedimentos para controle de *Salmonella* spp. em produtos (10). Frequentemente, a *Salmonella* spp., pode estar acompanhada de microrganismos interferentes, o que determina que o método de número mais provável (NMP) seja o mais indicado, em comparação a outras técnicas de contagem, já que etapas de enriquecimento em meios líquidos determinam uma maior eficiência de isolamento do microrganismo alvo (1).

O NMP é um método indireto de estimar a população bacteriana, baseado em probabilidades estatísticas. A técnica pode ser combinada com vários processos de identificação de *Salmonella*, assim, amostras de alimento, *swabs* ou água de enxágue podem ser associados (18). O NMP tem sido empregado para avaliar a qualidade microbiológica da água como potável ou não (24), bem como também para estimar a contaminação de carcaças de frango para *Salmonella* spp., desta forma mensurando o risco em adquirir uma infecção alimentar (2).

É uma técnica versátil que permite a enumeração de diferentes espécies de bactérias, alternando-se o meio de cultura e as condições de numeração para cada microrganismo. A aplicação deste ensaio foi proposto a partir de adaptações de métodos qualitativos para quantitativos, como a contagem de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e outros agentes que antes eram analisados somente pela presença ou ausência (32).

A técnica do NMP apresenta algumas vantagens em relação à contagem em placas, como a possibilidade de inocular quantidades maiores de amostras, aumentando proporcionalmente a quantidade do meio de cultura, oferecendo maior sensibilidade e flexibilidade no estabelecimento do limite de detecção. Outra vantagem é que permite a introdução de etapas de recuperação de células injuriadas, utilizando um meio não

seletivo para as etapas iniciais. No caso do NMP para *Salmonella* spp., ocorre uma adaptação de métodos qualitativos para quantitativos a partir de técnicas já validadas (33).

A contagem pelo NMP é realizada através de diluições seriadas de amostras alimentares em meios de culturas apropriados, que a seguir são incubados a temperaturas adequadas. Os tubos com crescimento positivo são submetidos a teste confirmatórios. O número de organismos na amostra original é determinado através de tabelas para estimativa de NMP, baseados no trabalho original de McCrady (23). Apesar da facilidade da execução e seleção de microrganismos através dos meios líquidos seletivos utilizados, o método não pode ser considerado preciso, sendo considerado, na verdade, uma estimativa, já que, os valores máximos e mínimos expressos nas tabelas consultadas estão bastante distantes (20).

A quantificação da contaminação por *Salmonella* desde as granjas até o abatedouro é fundamental para se estimar a extensão da contaminação nos cortes e carcaças de frangos e avaliar a efetividade das boas práticas de produção adotadas nas empresas para controle deste patógeno (7). Métodos de enumeração por Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) podem representar uma forma rápida, precisa e de baixo custo para a quantificação de microrganismos (34) em comparação com a metodologia tradicional para quantificação por séries de tubos denominada Número Mais Provável (NMP).

Uma metodologia de mNMP foi proposta utilizando o meio Rapaport Vassiliadis semi sólido (MRSV) para seleção de salmonelas móveis e posterior desenvolvimento em meios cromogênicos (12). Uma metodologia de mNMP baseada na ISO 6579:2002 foi validada usando MRSV e demonstraram não haver diferença significativa entre o NMP tradicional (tNMP) e o mNMP (27). As metodologias desenvolvidas, utilizaram o mNMP para quantificação e o MSRVS como meio de enriquecimento em dejetos de suínos e matrizes de origem avícola, respectivamente. Entretanto, não existem relatos de comparação entre estas metodologias em carne de frango.

### 3. CAPÍTULO 1

#### **Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte**

Lilian Andriva dos Santos<sup>1\*</sup>, Ligiani Mion<sup>1</sup>, Marcieli Marotzki<sup>1</sup>, Luana Parizotto<sup>1</sup>,  
Laura Beatriz Rodrigues<sup>1</sup>, Vladimir Pinheiro do Nascimento<sup>2</sup>, Luciana Ruschel dos  
Santos<sup>1</sup>

(Artigo submetido para publicação Pesquisa Veterinária Brasileira)

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

\* Correspondência autor: Lilian Andriva Santos, Bióloga, Especialista em Tecnologia e Controle de Qualidade de Alimentos, Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo. Rua: 10 de Abril, Centro. 99010-210 – Passo Fundo, RS, Brasil. Telefone 54 84421953. E-mail: lilian\_andriva@hotmail.com



## Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte<sup>1</sup>

Lilian Andriva dos Santos<sup>2</sup>, Ligiani Mion<sup>3</sup>, Marcieli Marotzki<sup>4</sup>, Luana Parizotto<sup>5</sup>, Laura Beatriz Rodrigues<sup>6</sup>, Vladimir Pinheiro do Nascimento<sup>7</sup>, Luciana Ruschel dos Santos<sup>6\*</sup>

**ABSTRACT.-** Santos L.A., Mion L., Marotzki M., Parizotto L., Rodrigues L.B., Nascimento V.P. & Santos L.R. 2014. [Miniaturized most probable number and conventional microbiology for isolation of *Salmonella* spp. in poultry slaughterhouses.] Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(0):00-00. Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, BR-285, Bairro São José, Passo Fundo, RS 99052-900, Brazil. E-mail: [luruschel@upf.br](mailto:luruschel@upf.br)

Poultry products can be important modes of transmission of *Salmonella* spp. to humans and, among several parameters used to determine food quality, microbiological characteristics play an essential role. The aim of this study was to determine and quantify *Salmonella* spp. at broiler slaughtering facilities. This was done by conventional microbiology and by the miniaturized most probable number (mMPN) methods. Samples were collected in three federally-inspected slaughterhouses, in triplicate, from six sites: reception of live birds (cloacal swabs and sponge samples from transport cages before and after sanitation) and carcass processing (after pre-chiller, after dripping, and before primary packaging and refrigeration at -12°C for 24 h), totaling 108 samples. Three of the six surveyed sites and two of the three slaughterhouses were contaminated with *Salmonella* spp., showing an infection rate of 5.5% independently of the method used, and revealing that transport cages were contaminated after sanitation. No correlation could be established between the results of conventional microbiology and mMPN methods, and contamination along the slaughtering line could not be quantified. This indicates the importance of combining qualitative and quantitative methods for the enumeration of *Salmonella* when detection rates are lower than the proposed mMPN limit (0.13 MPN/mL). Typhimurium, Panama, Lexington and Rissen, which are paratyphoid organisms and are potentially infectious to humans, were identified. However, these serovars were isolated at the reception of live birds (from cloacal swabs and from transport cages) rather than from the end products. Given that *Salmonella* spp. was detected in transport cages after sanitation, it is paramount that automated washing procedures currently used in slaughterhouses be reassessed and adjusted.

INDEX TERMS: *Salmonella* spp., miniaturized most probable number, serovars, poultry slaughterhouses.

**RESUMO.-** Os produtos de origem avícola podem ser importantes veículos de transmissão de *Salmonella* spp. para humanos e, dentre os vários parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, destacam-se os que definem suas características microbiológicas. Objetivou-se detectar e quantificar *Salmonella* spp. na tecnologia de abate de frangos de corte por microbiologia

<sup>1</sup> Recebido em...

<sup>2</sup> Bióloga. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Universidade de Passo Fundo (UPF), BR-285, Bairro São José, Passo Fundo, RS 99052-900.

<sup>3</sup> Graduada. Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV).

<sup>4</sup> Graduada do Curso de Medicina Veterinária, FAMV-UPF, Passo Fundo, RS. Bolsista PIBIC UPF.

<sup>5</sup> Graduada do Curso de Medicina Veterinária, FAMV-UPF, Passo Fundo, RS. Bolsista PIBIC CNPq.

<sup>6</sup> Curso de Medicina Veterinária, FAMV-UPF, Passo Fundo, RS. \*Autor para correspondência:

[luruschel@upf.br](mailto:luruschel@upf.br)

<sup>7</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.

convencional (MC) e número mais provável miniaturizado (mNMP). As coletas foram realizadas em três abatedouros sob Inspeção Federal e em seis pontos de coleta, em triplicata, definidos como: recepção das aves (*swabs* de cloaca e esponjas de gaiolas de transporte antes e após a higienização) e carcaças (após pré resfriamento em *chiller*, após o gotejamento e antes da embalagem primária e congeladas a -12°C por 24 horas), totalizando 108 amostras. Identificou-se *Salmonella* spp. em três dos seis pontos do fluxograma de abate e em dois dos três estabelecimentos amostrados, considerando os dois métodos utilizados, perfazendo 5,5% de positividade, onde destaca-se a contaminação nas gaiolas de transporte das aves após a higienização. Não foi possível correlacionar os resultados da microbiologia convencional e do mNMP ou mesmo quantificar a contaminação ao longo da tecnologia de abate, o que indica a necessidade de se utilizar um método qualitativo aliado ao método de quantificação quando *Salmonella* estiver presente em quantidades inferiores ao limite de detecção do mNMP proposto (0,13 NMP/mL). Os sorovares identificados foram Typhimurium, Panama, Lexington e Rissen, considerados paratíficos e, portanto, potencialmente capazes de causar infecções em humanos, embora estes sorovares não tenham sido isolados em produtos finais e sim na chegada dos frangos aos abatedouros (*swabs* de cloaca e gaiolas de transporte). A identificação de *Salmonella* spp. nas gaiolas de transporte após a higienização é um indicativo da necessidade de revisão e adequação dos métodos automatizados de lavagem atualmente utilizados nos abatedouros.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Salmonella* spp.; número mais provável miniaturizado, sorovares, frangos de corte.

## INTRODUÇÃO

Infecções por *Salmonella* são associadas à criação intensiva das aves e à surtos de salmonelose clínica, visto que as contaminações podem ocorrer tanto por contato entre aves saudáveis e infectadas como por contaminação cruzada nos abatedouros, onde o número de bactérias é variável nas diferentes etapas da tecnologia de abate. Análises microbiológicas desde o campo até os produtos finais são fundamentais para estimar a extensão da carga microbiana e avaliar os efeitos dos métodos de controle sanitário utilizados nos frigoríficos, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

A pesquisa de *Salmonella* spp. para avaliação da contaminação em abatedouros por métodos qualitativos já é realizada, mas a quantificação da bactéria não é rotineiramente empregada, uma vez que técnicas tradicionais de enumeração como o Número Mais Provável (NMP), que utilizam séries de tubos múltiplos, demandam tempo, pessoal e recursos financeiros elevados (Cavada et al. 2010), dificultando sua aplicação em programas de monitoria. Métodos de quantificação de bactérias por Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) são citados como uma alternativa mais rápida e menos trabalhosa para enumeração de salmonelas (Fravallo et al. 2003, Pavic et al. 2009) mas foram apenas aplicados em amostras artificialmente contaminadas para validação destas técnicas.

Infecções por *Salmonella* spp. são classificadas como enfermidades típicas de aves, causadas pelos sorovares Pullorum e Gallinarum, e enfermidades paratíficas, originadas por mais de 2500 sorovares não específicos potencialmente capazes de produzir infecções alimentares em humanos. Destes, cerca de 10% são isolados em aves, uma vez que a distribuição de salmonelas oriundas de fontes avícolas é geograficamente variável e alterna-se com o passar dos anos (Gast et al. 2007).

Assim, devido à importância do controle de *Salmonella* spp. na produção avícola e o risco potencial em saúde pública, objetivou-se utilizar o método microbiológico convencional e Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) para identificação e quantificação de *Salmonella* spp. em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte bem como relatar os sorovares isolados nos pontos positivos para a bactéria.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem e pontos de coleta nos abatedouros

As coletas foram realizadas em três abatedouros de frangos de corte (A, B e C) sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) no sul do Brasil, entre setembro de 2013 e janeiro de 2014, com duas visitas

em cada abatedouro. Determinou-se seis pontos de coleta em função dos resultados de estudos anteriores (dados ainda não publicados) que apontaram estes pontos com positividade para *Salmonella* spp., como segue: recepção das aves (*swabs* de cloaca e esponjas de gaiolas de transporte antes e após a higienização) e carcaças após pré resfriamento em *chiller*, após o gotejamento e imediatamente antes da embalagem primária e carcaças congeladas a  $-12^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Cada um dos pontos foi coletado em triplicata, totalizando 108 amostras, que foram processadas no Laboratório de Bacteriologia do Hospital Veterinário da UPF por microbiologia convencional (MC) e número mais provável miniaturizado (mNMP), perfazendo 240 ensaios para detecção e quantificação de *Salmonella* spp, respectivamente, incluindo os controles negativo (*Escherichia coli* ATCC 25992) e positivo (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076). Todo o material coletado foi transportado sob refrigeração e imediatamente processado quando da chegada ao laboratório. O método de microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. baseou-se na ISO 6579 (2002) com modificações e o método de mNMP utilizado foi descrito por Fravallo et al. (2003) e adaptado por Colla et al. (2014).

### **Processamento das amostras**

#### **Swabs de cloaca**

Para os *swabs* cloacais foram amostradas 300 aves em cada coleta, sendo utilizado um *swab* para cada duas aves, compondo três *pools* de 50 *swabs* que foram acondicionados em frascos com 50 mL de água peptonada tamponada (APT 1,0%). No laboratório, homogeneizou-se os *pools* e retirou-se alíquotas de 17,5 mL, sendo 7,5 mL destinados ao mNMP e 10 mL à microbiologia convencional.

#### **Esponjas de gaiolas de transporte**

As gaiolas de transporte foram identificadas com lacres oficiais para controle de retirada das mesmas após a higienização no sistema automatizado de lavagem utilizado nos abatedouros avaliados. A amostragem foi realizada com esponjas bacteriológicas com neutralizante (*Sponge Stick Neutraling Buffer* 3M) por toda a extensão interna da gaiola, antes e após a lavagem e sanitização. As esponjas foram acondicionadas em saquetas fornecidas pelo fabricante e no laboratório adicionados 50 mL de APT 1,0%. Homogeneizou-se as amostras e retirou-se 17,5 mL para as demais análises (7,5 mL para mNMP e 10 mL para MC).

#### **Carcaças**

As carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos individuais e identificadas com lacres oficiais. No laboratório adicionou-se 400 mL de APT 1,0% para rinsagem das carcaças e retirou-se 17,5 mL para as análises subsequentes.

### **Pesquisa de *Salmonella* spp. por microbiologia convencional**

Alíquotas de 10 mL de APT 1,0% foram incubadas a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 16 a 20 horas e repicadas em meios seletivos, sendo 1 mL em 9 mL de caldo Tetracionato (incubação a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 3$  horas) e 100  $\mu\text{L}$  em 9,9 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (incubação a  $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 3$  horas). O plaqueamento das amostras foi realizado em Agar Rambach (Merck®) e Agar Verde Brilhante Novobiocina (BGN - *Brilhant Green Novobiocin*) por esgotamento com alça de platina e as placas incubadas a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 3$  horas. Colônias sugestivas de *Salmonella* spp. foram submetidas as provas de TSI (*Triple Sugar Iron*), LIA (*Lysine Iron Agar*), SIM (*Sulfite- Indole-Motility*), caldo ureia e sorologia com soro polivalente anti-O. A identificação final dos isolados foi realizada por *microarray* (Chek&Trace® *Salmonella*).

### **Quantificação de *Salmonella* spp. por Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP)**

Para quantificação de *Salmonella* spp. nas amostras naturalmente contaminadas foi utilizado o método do mNMP proposto por Fravallo et al. (2003) e adaptado por Colla et al. (2014), que contém as mesmas fases da microbiologia convencional mas executadas em placas de 24 poços com capacidade para 2,5 mL. Previamente ao experimento foram realizados ensaios para determinar o limite de quantificação do mNMP em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas com *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, que apontaram um limite de 0,13 NMP/mL. Na condução do experimento utilizou-se os 7,5 mL oriundos do processamento das amostras e transferiu-se 2,5 mL para cada um dos poços das três primeiras cavidades na primeira linha das placas, representando uma amostra. Destes, 0,5 mL de cada cavidade foram transferidos para 2 mL de água peptonada 1,0%, previamente vertidos nas linhas seguintes na mesma placa. Três diluições

sucessivas foram realizadas da mesma maneira. As placas foram então incubadas para o pré-enriquecimento a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  por 16 a 20 horas.

Para enriquecimento seletivo utilizou-se *Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis* (MSRV) com novobiocina. O MSRV é uma modificação do caldo de enriquecimento Rappaport Vassiliadis, tornando-o semi-sólido, o que permite a detecção visual de motilidade bacteriana pela formação de um halo em torno do ponto de inoculação (Baggensen et al. 2001).

Após o pré-enriquecimento, as placas foram mantidas em agitação orbital por três a cinco minutos e, com pipetador multicanal, transferiu-se  $20\mu\text{L}$  de cada poço para a cavidade correspondente em outra placa contendo 2 mL de MSRV, incubando-as por 24 a 48 horas a  $41,5\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Após este período, a viragem da cor azul esverdeada do meio MSRV para a cor branca ou azul claro era indicativa de crescimento bacteriano, o que era confirmado pela semeadura do conteúdo destes poços em Agar Rambach®. Colônias com crescimento compatível com *Salmonella* spp. foram semeadas em Agar não seletivo, incubadas a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas e submetidas a confirmação bioquímica e sorológica como na microbiologia convencional.

### Cálculo do Número Mais Provável miniaturizado

Caracterizou-se como positivos os poços que tiveram isolamento de *Salmonella* spp. confirmado pelos testes bioquímicos e soro polivalente anti-O. A partir destes resultados foram estabelecidos os poços positivos e negativos usados para o cálculo do número mais provável (NMP) de diluições seriadas não decimais utilizando uma fórmula simplificada (Thomas, 1942), como segue:

$$\text{NMP / g ou mL} = P / \sqrt{NT}$$

Sendo:

P = número de tubos positivos;

N = soma da quantidade de amostra inoculada em todos os tubos negativos;

T = soma da quantidade de amostra inoculada em todos os tubos.

No método utilizado inoculou-se 2,5 mL em três poços na linha A das placas (A1, A2, A3), determinando-se a primeira linha (A) de poços como amostra inicial (1:1), e a segunda (B) como 1:5. Seguiu-se a diluição seriada não decimal na base 5, obtendo-se, deste modo, as diluições 1:1, 1:5, 1:25, 1:125, com volumes de alíquotas respectivamente de 2 mL, 0,5 mL, 0,1 mL e 0,02 mL. Aplicando-se a fórmula de Thomas (1942) para cálculo do resultado a partir da combinação de tubos 2:0:0 em séries de três tubos, utilizou-se os volumes das alíquotas para cálculo do NMP, como segue:

$$\text{NMP / mL} = P / \sqrt{NT}$$

Sendo:  $P = 2 + 0 + 0 + 0 = 2$

$$N = (1 \times 2) + (3 \times 0,5) + (3 \times 0,1) + (3 \times 0,02) = 2 + 1,5 + 0,3 + 0,06 = 3,86$$

$$T = (3 \times 2) + (3 \times 0,5) + (3 \times 0,1) + (3 \times 0,02) = 6 + 1,5 + 0,3 + 0,06 = 7,86$$

Portanto:

$$\text{NMP / mL} = 2 / \sqrt{(3,86) \times (7,86)} = 2 / \sqrt{30,3396} = 2 / 5,51$$

$$\text{NMP / mL} = 0,36$$

A aplicação desta fórmula foi comparada com os resultados obtidos pelo programa *MPN Calculator* (Cariale, sem data), que possibilita o cálculo dos resultados padronizados pelo volume de amostra por teste, número de tubos e mais de 3 diluições. Calculou-se o NMP por mL e os limites mínimos e máximos do intervalo de confiança a 95% de probabilidade (IC 95%). Assim, utilizou-se o *MPN Calculator* para finalizar os cálculos das combinações de tubos obtidas neste trabalho, com combinação de tubos positivos em séries de 3, com quantidade inoculada de amostra de 2; 0,5; 0,1 e 0,02 mL.

Para a obtenção do resultado final, referente à área das gaiolas de transporte, o NMP obtido pela combinação de poços positivos precisa ser convertido para NMP/cm<sup>2</sup>, utilizando o cálculo a seguir:

$$\text{NMP/cm}^2 = \frac{\text{NMP/mL da suspensão} \times \text{Área amostrada}}{\text{Volume de diluente utilizado}}$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificou-se *Salmonella* spp. em três dos seis pontos do fluxograma de abate de frangos de corte e em dois dos três estabelecimentos amostrados, independentemente do método utilizado (Tabela 1), totalizando 5,5% de positividade (6/108).

A positividade para *Salmonella* spp. nos abatedouros amostrados (5,5%) foi inferior a citada por Santos et al. (2000) com 32%, ou Lillard (1990), que relatou 5% de positividade para *Salmonella* spp. na chegada das aves e uma contaminação de 36% após o processamento. Já Dickel et al. (2005), Ribeiro et al. (2007), Moreira et al. (2009), Duarte et al. (2009) e Simas et al. (2011) referem variações de 3% a 39% no isolamento de *Salmonella* spp. em origens como abatedouro e varejo.

Destaca-se que no presente trabalho o isolamento inicial da bactéria em *swabs* cloacais e gaiolas de transporte não foi confirmado nos produtos finais (carcaças resfriadas e congeladas), o que pode ser atribuído aos procedimentos de Boas Práticas de Fabricação, PPHO e APPCC adotados nos abatedouros amostrados. Quando pontos críticos da tecnologia de abate são adequadamente manejados, com renovação de água e temperaturas inferiores a 4°C no *chiller*, por exemplo, ocorre redução da contaminação inicial por *Salmonella* spp. como citado por Dickel et al. (2005) com redução de 70% para 20%, e Simas et al. (2011), de 15,8% para 3,3% em carcaças de frango após o *chiller*. Estes efeitos são corroborados por Humphrey & Jorgensen (2006) ao citar que a contaminação inicial nas aves pode ser reduzida com higiene adequada na tecnologia de abate, ou ainda Patterson (1971), para quem a condição microbiológica da carcaça é influenciada pela planta de abate, qualidade da matéria prima, fluxograma e equipamentos, bem como eficácia da higienização.

Entretanto, mesmo com a adequação dos procedimentos adotados para redução de uma contaminação pré-existente por *Salmonella* spp. é premente que se revise o sistema automatizado de lavagem de gaiolas e a eficácia dos sanitizantes utilizados, uma vez que as gaiolas amostradas mantiveram a contaminação pela bactéria após higienizadas. A correta higienização dos caminhões e das gaiolas de transporte é fundamental porque são fontes potenciais de contaminação cruzada. Este relato é corroborado por Corry et al. (2002), que ao analisar gaiolas de transporte quanto à presença de *Salmonella* spp. no descarregamento dos frangos e após a lavagem e desinfecção identificou os mesmos sorovares antes e após a higienização das gaiolas, geralmente refletindo os sorovares isolados a campo.

A técnica para pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos é um método clássico de presença/ausência, desenvolvido para garantir a detecção da bactéria em situações desfavoráveis como microbiota competidora, número reduzido de *Salmonella* e/ou células injuriadas por métodos de conservação como calor, congelamento e secagem. Dada a variedade de alimentos que podem conter *Salmonella* spp., estimar o número de células presentes em uma amostra tem sido um desafio. O número mais provável (NMP) para quantificação de *Salmonella* spp. é descrito por diversos autores em diferentes matrizes (Chen et al. 2013, Ta et al. 2014, Yang et al. 2014, Mazengia et al. 2014, Wang et al. 2014). Porém, os autores concluem que pesquisas adicionais são necessárias para ampliar a eficácia dos métodos de quantificação de patógenos em ambientes de produção comercial.

A avaliação e implantação de metodologias de NMP simplificadas, como o NMP miniaturizado, poderia ser uma alternativa para a quantificação rotineira de *Salmonella* spp. Entretanto, com o método utilizado neste trabalho, não foi possível correlacionar totalmente os resultados da microbiologia convencional e do mNMP ou mesmo quantificar a contaminação ao longo da tecnologia de abate de frangos de corte. A positividade para *Salmonella* spp. foi obtida pelos dois métodos apenas em duas amostras *swabs* de cloaca e esponjas de gaiola de transporte antes da higienização, sendo 1,8% (2/108) pelo mNMP e 5,5% (6/108) pelo método microbiológico convencional (Tabela 1).

Estes resultados não confirmam os relatados por autores que mostraram diferentes formas de miniaturização do NMP para quantificação de *Salmonella*. Fravallo et al. (2003) propuseram uma metodologia de mNMP utilizando o MSRV para seleção de salmonelas móveis e posterior desenvolvimento em meios cromogênicos enquanto Pavic et al. (2009) validaram uma metodologia de mNMP baseada na ISO 6579:2002 usando MRSV e demonstraram não haver diferença significativa entre o NMP tradicional e o miniaturizado. Os autores utilizaram o meio Rapaport Vassiliadis semi sólido (MRSV) para enriquecimento em dejetos de suínos e matrizes de origem avícola, respectivamente. Já Colla et al. (2014), ao comparar os dois métodos, observaram que a técnica descrita por Fravallo et al. (2003) foi eficaz para quantificação de *Salmonella* spp. em matriz cárnea de origem avícola, enquanto que com a técnica descrita por Pavic et al. (2009) não foi possível quantificar o patógeno, provavelmente devido à problemas relacionados com a aquisição de insumos semelhantes aos utilizados na técnica original.

Os resultados do presente trabalho, que utilizou a metodologia de Fravallo et al (2003) adaptada por Colla et al. (2014), podem ser inicialmente atribuídos a heterogeneidade das amostras, em concordância com Skjerve & Olsvik (1991), ao citar que a matriz afeta a sensibilidade

e a especificidade de um protocolo de isolamento e representaria ambientes críticos avícolas, que variam de amostras com baixa umidade e altamente úmidas (carcaças e água do tanque de escaldagem) até ambientes altamente competitivos (cecos e fezes) (USDA-FSIS, 2008). Também o limite de detecção do mNMP (0,13 NMP/mL, dados não mostrados) ou os volumes diminutos utilizados no pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, em comparação com a microbiologia convencional, podem ter influenciado negativamente a quantificação das amostras. Assim, é necessário utilizar um método qualitativo aliado ao método de quantificação, uma vez que quando *Salmonella* spp. estiver presente em quantidades inferiores ao limite de detecção do mNMP proposto a microbiologia convencional é mais eficiente para a detecção do patógeno.

Mesmo sem correlação entre os métodos para identificação e/ou quantificação de *Salmonella* spp. foi possível isolar os sorovares descritos na Tabela 2. Os sorovares identificados são paratíficos e, portanto, potencialmente capazes de causar infecções em humanos. Também, segundo o *CODEX Alimentarius*, a presença de qualquer sorovar de *Salmonella* spp. com importância em saúde pública, em um alimento é suficiente para classificá-los como impróprio para consumo, tanto no mercado nacional como no internacional. Mesmo que no presente trabalho *Salmonella* spp. não tenha sido isolada em produtos finais, a positividade nos abatedouros amostrados indica que as medidas de controle devem ser reforçadas visando a não contaminação dos produtos destinados ao consumo humano.

Dentre os sorovares isolados, *S. Typhimurium* é frequentemente isolada em casos clínicos em suínos e humanos, além de apresentar multirresistência à antimicrobianos e a capacidade de formar biofilmes como um fator determinante na contaminação de equipamentos na indústria (Castelijm et al. 2013). Em países como a Alemanha (Methner et al. 2011), Portugal (Gomes-Neves et al. 2012), China (Yang et al. 2013) e Inglaterra (Muellerdoblies et al. 2013) é o sorovar mais isolado em carcaças de suínos, semelhante aos estudos em abatedouros no Brasil (Castagna et al. 2004, Bessa 2006, Borowsky et al. 2006, Muller et al. 2009, Kich et al. 2011).

O sorovar Panama faz parte do sorogrupo D1 sendo regularmente isolado de alimentos, animais e água. É relacionado com gastroenterites em humanos e parece ser capaz de causar doenças mais invasivas do que outros sorovares, com relatos de bacteremia e meningite em crianças (Noel et al. 2010).

*S. Rissen* é pouco frequente em infecções em humanos e não tem um reservatório específico identificado, mas a importância deste sorovar está aumentando em países como a Tailândia, com ocorrência em água e alimentos, principalmente frutos do mar. Na Finlândia, *S. Rissen* tem sido frequentemente isolada em aves desde 2003 (Bangtrakulnonth et al. 2004) e, no Brasil, há relatos de isolamento em humanos entre 1950 e 1990 (Kumar et al. 2001). No entanto, o maior risco para a população brasileira estaria relacionado principalmente ao consumo de carne suína, uma vez que o sorovar é comumente isolado nesta espécie (Fernandes et al. 2006).

Segundo Hofer et al. (2007) a *S. Lexington* não é rotineiramente isolada em aves comerciais no Brasil, mas já foi relatada em carne de pato comercializada no varejo no Vietnã (Pham et al. 2005, Benajssaum et al. 2007). Berchieri et al. (2013) pesquisou *Salmonella* spp. em codornas e observou 75% de positividade, e *S. Lexington* foi recuperada do tanque de escaldagem, água de refrigeração e carcaças.

O fato de diferentes sorovares terem sido isolados em um mesmo ponto de amostragem ou por métodos microbiológicos diversos, ou ainda sem relação entre *swabs* de cloaca e gaiolas de transporte (Tabela 2) seria mais um indicativo da complexidade do ciclo de infecção e reinfecção por *Salmonella* e da dificuldade em se estabelecer programas de controle efetivos para o patógeno, em consonância com Müller et al. (2009), para quem a infecção por múltiplos sorovares é uma característica já reconhecida em suínos, mesmo em amostras colhidas de um mesmo animal.

A infecção por *Salmonella* pode ter origens distintas nas granjas comerciais e em abatedouros, o que justifica a variabilidade dos sorovares encontrados em cada região (Alban & Stark 2005). No Brasil, destacam-se estudos sobre sorovares isolados na região sul (Castagna et al. 2004, Bandeira et al. 2007, Spricigo et al. 2008, Michael et al. 2008, Muller et al. 2009, Kich et al. 2011) e centro-oeste (Silva et al. 2009) onde são observadas diferenças entre os sorovares isolados em cada estudo, possivelmente devido a extensão do país e a variedade da produção animal.

## CONCLUSÕES

Não foi possível correlacionar integralmente os resultados da microbiologia convencional e do mNMP ou mesmo quantificar a contaminação nos pontos amostrados, indicando a necessidade de aliar métodos qualitativos e quantitativos para identificação de *Salmonella* em pontos críticos de

controle no abate de frangos de corte. Os sorovares identificados são considerados paratíficos e, portanto, potencialmente capazes de causar infecções em humanos. A identificação de *Salmonella* spp. nas gaiolas de transporte após a higienização é um indicativo da necessidade de revisão e adequação dos métodos automatizados de lavagem atualmente utilizados nos abatedouros.

## REFERÊNCIAS

- Alban L. & Stärk K.D.C. 2005. Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* presence in the slaughtered swine carcass effectively? Preventive Veterinary Medicine. Amsterdam. 68:63-79.
- Baggensen D.L., Bagger J., Mogelmose V., Nielsen B., Svensmark B. & Olsen J.E. 2001. Quantification of DT104 in slurry from infected pigs. Report on the 6<sup>th</sup> Workshop organized by CRL – *Salmonella*. June 11-12, Report 284500019/2001. RIVM, Bilthoven, Belgium. p.30-32.
- Bandeira R., Pelegrini D.C.P. & Cardoso M. 2007. Ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes de pernil provenientes de lotes suínos portadores ao abate. Acta Scientiae Veterinariae. Porto Alegre. 35:203-208.
- Bangtrakulnonth A., Pornreongwong S., Pulsrikarn C., Sawanpanyalert., Hendriksen R.S., Wong D.M.A.L.F. & Aarestrup F.M. 2004. *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. Emerg Infect Dis. 10:131-6.
- Benajssaum B.R., Gallasum N., Troudiem B.H., Belhadjum B. & Belhadium A.B. 2007. Trends in *Salmonella* enterica serotypes isolated from food, humans, animals and environment in Tunisia, 1994-2004. The Journal of Infection. 55:324-339.
- Berchieri J., Freitas Neto O.C. de., Angela H.L. da., Soares N.M., Guastalli E.A.L. & Almeida A.M. de. 2013. *Salmonella* spp. in Meat-type Quails (*Coturnix coturnix*) in the State of São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Poultry Science. Revista Brasileira de Ciência Avícola. 15(3):169-286.
- Bessa M.C. 2006. Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* enterica sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul. 144 F. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Borowsky L.M., Bessa M.C., Cardoso M.I. & Avancini C.A.M. 2006. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. Ciência Rural. Santa Maria. 36(5):1474-1479.
- Castagna S.M.F., Bessa M.C., D.A., Carvalho M., Cardoso. & Costa M. 2001. Resistência a antimicrobianos de amostras de *Salmonella* sp. isoladas de suínos abatidos no estado do rio grande do sul. Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS. 29(1): 44-49.
- Castelijn G.A.A., Parabirsing J.A., Zwietering M.H., Moezelaar R. & Abee T. 2013. Surface behavior of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Bradenburgand*, *S. Infantis*. Veterinary Microbiology. Amsterdam. 161:305-314.
- Cavada C.A., Cardoso F.M. & Schimidt V. 2010. Comparison of three methods for *Salmonella* sp. quantification in wastewater. Acta Scientiae Veterinariae. 38(1):17-23.
- Chen L., Zhang J., Yang X., Wu Q. & Xu M. 2013. [Prevalence and characterization of *Salmonella* spp. from foods in South China]. [Article in Chinese]. Wei Sheng Wu Xue Bao. 4;53(12):1326-33.
- Colla F.L., Mion L., Parizotto L., Rodrigues L.B., Pilotto F., Dickel E.L., Nascimento V.P do. & Santos L.R dos. 2014. Miniaturized most probable number for the enumeration of *Salmonella* sp in artificially contaminated chicken meat. Revista Brasileira de Ciência Avícola. 16(1):45-48.
- Corry J. E. L., Allen V. M. & Hudson W. R. 2002. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. Journal of Applied microbiology. 92:424-432.
- Dickel E.L., Santos L.R., Rodrigues L.B., Valle S.F. & Cecatti D. 2005. Ocorrência de *Salmonella* em abatedouros de aves com tecnologia totalmente automatizada (grande porte), semi automatizada (médio porte) e semi automatizada (pequeno porte). Higiene Alimentar. São Paulo. 19(131):62-67.
- Duarte D.A.M., Ribeiro A.R., Vasconcelos A.M.M., Santos S.B., Silva J.V.D., Andrade P.L.A de. & Falcão L. 2009. Ocorrência de *Samonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. Brazilian Journal of Microbiology. 40(3):569-573.
- Fernandes S.A., Tavechio A.T., Ghilardi A.C.R., Dias A.M.G., Almeida I.A. & Melo L.C.V. 2006. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 48:174-189.

- Fravalo P., Hascoet Y., Le Fellic M., Quegumer S., Petton J. & Salvat G. 2003. Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella* enteric contamination: the mini-MSRV MPN technique. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 11(2): 81– 88.
- Gast R., Guraya R. & Guard-Bouldin J. 2007. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. *Avian Diseases*, 51:40-44.
- Gomes-Neves E., Antunes P., Tavares A., Themudo P., Cardoso M.F., Gärtner F., Costa J.M. & Peixe L. 2012. *Salmonella* cross contamination in swine abattoirs in Portugal: Carcasses, meat and meathandlers. *International Journal of Food Microbiology*. Amsterdam. 157:82-87.
- Hofer E., Silva S.J. 1998. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. *Pesq. Vet. Bras*. 18(1):21-27.
- Humphrey T. & Jorgensen F. 2006. Pathogens on meat and infection in animals. Establishing a relationship using *Campylobacter* and *Salmonella* as examples. *Meat Science*. 74:89-97.
- Kich J.D., Coldebella A., Morés N., Nogueira M.G., Cardoso M., Fratamico P.M., Call J.E., Fedorka-Cray P. & Luchansky J.B. 2011. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, 32 Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. Amsterdam. 151:307-313.
- Kumar S., Sadana J.R. & Mishra S.K. 2001. Studies on clinical signs, growth response and haematological changes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) infected with *Salmonella* typhimurium. *Indian Journal of Poultry Science*. 36:335-337.
- Lillard H.S. 1990. The Impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. *Journal Food Protection*. Des Moines. 53(3):202-204.
- Mazengia E., Samadpour M., Hill H.W., Greeson K., Tenney K., Liao G., Huang X. & Meschke J.S. 2014. Prevalence, concentrations, and antibiotic sensitivities of *Salmonella* serovars in poultry from retail establishments in Seattle, Washington. *J Food Prot*. 77(6):885-93.
- Methner U., Rammner N., Fehlhaber K. & Rösler U. 2011. *Salmonella* status of pigs at slaughter — Bacteriological and serological analysis Ulrich 33 *International Journal of Food Microbiology*. Amsterdam, 151:15-20.
- Michael G.B., Cardoso M. & Schwarz S. 2008. Molecular analysis of multi resistant porcine *Salmonella* enterica subsp. Enterica serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II. *Journal of Antimicrobial Agents*. Oxford. 32:120-129.
- Moreira G.N., Rezende C.S.M., Carvalho R.N., Mesquita S.Q.P de., Oliveira A.N.de. & Arruda M.L.T. 2009. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 67(2):126-130.
- Mueller-Doblies D., Speed K. & Davies R.H. 2013. A retrospective analysis of *Salmonella* serovars isolated from pigs in Great Britain between 1994 and 2010. *Preventive Veterinary Medicine*. Amsterdam. 110:447-455.
- Müller M., Schwarz P., Kich J.D. & Cardoso M. 2009. Perfil sorológico e de isolamento de *Salmonella* sp. em suínos no início da terminação e ao abate. *Ciência Animal Brasileira*. 10(3):931-937.
- Noel H., Hofhuis A., De Jong R., Heuvelink A.E., De Jong R. & Jager C. 2010. Consumption of Fresh Fruit Juice: How a Healthy Food Practice Caused a National Outbreak of *Salmonella* Panama Gastroenteritis. *Foodborne Pathogens and Disease*. 7(4):375-381.
- Patterson J.T. 1971. Microbiological aspects of poultry processing. *British Poultry Science*. 12:197-203.
- Phan T.T., Khai L.T., Ogasawara N., Tam N.T., Okatani A.T., Akiba M. & Hayashidani H. 2005. Contamination of *Salmonella* in retail meats and shrimps in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Food Protection*. 68:1077-1080.
- Pavic A., Groves P.J., Bailey G. & Cox J.M. 2009. A validated miniaturized MPN method, based on ISO 6579:2002, for the enumeration of *Salmonella* from poultry matrices. *Journal of Applied Microbiology*. 109:25-34.
- Ribeiro A.R., Kellermann A., Santos L.R dos., Bessa M.C. & Nascimento V.P do. 2007. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:296-299.
- Santos D.M.S., Berchieri Jr A., Fernandes S.A., Tavechio A.T. & Amaral L.A. 2000. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 20(1):39-42.



- Silva M.C., Faria G.S., De Paula D.A.J., Martins R.P., Caramori Junior J.G., Kichi J.D., Colodel E.D., Nakazato L. & Dutra V. 2009. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. *Ciência Rural*. Santa Maria. 39:266-268.
- Simas V.S., Santos F.F., Gouvêa R., Aquino M.H.C., Abreu D.L.C., Nascimento E.R. & Pereira V.L.A. 2011. Pré-resfriamento na redução de coliformes em carcaças de frango de corte. *Ciência Rural*. 43(9):1618-1622.
- Skjerve E. & Olsvik O. 1991. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. *International Journal of Food Microbiology*. 14:11-18.
- Spricigo D.A., Matsumoto S.R., Espíndola M.L. & Ferraz S.M. 2008. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiçafrescal suína. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. 28:779-785.
- Ta Y.T., Nguyen T.T., To P.B., Pham X., Le H.T., Thi G.N., Alali W.Q., Walls I. & Doyle M.P. 2014. Quantification, serovars, and antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from retail raw chicken meat in Vietnam. *J Food Prot*. 77(1):57-66.
- USDA-FSIS (United States Department of Agriculture — Food Safety Inspection Service), 2008. Compliance Guideline for Controlling Salmonella and Campylobacter in Poultry Second Edition May. (Available at: <http://www.fsis.usda.gov> (Accessed March 2013)).
- United States Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service. Compliance guideline for controlling *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry. 2nd ed. 2008 [cited 2008 Set]. Available from: <http://www.fsis.usda.gov>.
- Wang Y., Chen Q., Cui S., Xu X., Jianghui Zhu., Luo H., Wang D. & Li F. 2014. Enumeration and Characterization of *Salmonella* Isolates from Retail Chicken Carcasses in Beijing, China. *Foodborne Pathogens and Disease*. 11(2):126-132.
- Yang B., Cui Y., Shi C., Wang J., Xia X., Xi M., Wang X., Meng J., Alali W.Q., Walls I. & Doyle M.P. 2014. Counts, serotypes, and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates on retail raw poultry in the People's Republic of China. *J Food Prot*. 77(6):894-902.
- Yang B., Qiao L., Zhang X., Cui Y., Xia X., Cui S., Wang X., Meng X., Ge W., Shi X., Wang D. & Meng J. 2013. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. *Food Control*. Guildford. 32:228-235.

**Tabela 1. Positividade para *Salmonella* spp. nos abatedouros de frangos de corte amostrados por microbiologia convencional (MC) ou mNMP.**

Amostras	Abatedouro A		Abatedouro B		Abatedouro C	
	Metodologia		Metodologia		Metodologia	
	MC	mNMP	MC	mNMP	MC	mNMP
Swabs de cloaca	+	0,6/mL 2,9/mL	-	-	+	-
Esponjas de gaiolas de transporte antes da higienização	+	2,3/cm <sup>2</sup> 8,5/cm <sup>2</sup>	-	-	+	-
Esponjas de gaiolas de transporte após a higienização	+	-	-	-	+	-
Carcaças após pré resfriamento	-	-	-	-	-	-
Carcaças após o gotejamento e antes da embalagem primária	-	-	-	-	-	-
Carcaças congeladas a -12°C por 24h	-	-	-	-	-	-

Legenda: + (isolamento positivo) e (- sem isolamento).

**Tabela 2. Sorovares de *Salmonella* isolados na tecnologia de abate de frangos de corte por microbiologia convencional (MC) ou mNMP.**

Amostras	Abatedouro A		Abatedouro C	
	Metodologia		Metodologia	
	MC	mNMP	MC	mNMP
<i>Swabs</i> de cloaca	Rissen	Rissen	Panama	-
Esponjas das gaiolas de transporte antes da higienização	Lexington	Typhimurium Lexington	Lexington	-
Esponjas das gaiolas de transporte após a higienização	Lexington	-	Lexington	-

#### 4. CONCLUSÕES

Analisando o cenário mundial atual observa-se que, em conjunto com avanços tecnológicos cada vez maiores, há uma preocupação crescente com a qualidade e inocuidade dos alimentos atualmente consumidos. Durante décadas, a segurança microbiológica de alimentos baseou-se exclusivamente no atendimento de padrões e critérios microbiológicos pré-estabelecidos. Com esse estudo e com os resultados obtidos podemos concluir que:

- a) Não foi possível correlacionar integralmente os resultados da microbiologia convencional e do mNMP ou mesmo quantificar a contaminação nos pontos amostrados, indicando a necessidade de aliar métodos qualitativos e quantitativos para identificação de *Salmonella* em pontos críticos de controle no abate de frangos de corte.
- b) Os sorovares identificados são considerados paratíficos e, portanto, potencialmente capazes de causar infecções em humanos.
- c) A identificação de *Salmonella* spp. nas gaiolas de transporte após a higienização é um indicativo da necessidade de revisão e adequação dos métodos automatizados de lavagem atualmente utilizados nos abatedouros.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos últimos anos, vários esforços têm sido feitos pela indústria para controlar o *Salmonella* spp. em carcaças, com vários controles e diretrizes regulamentares como, por exemplo, HACCP. Mudanças na ocorrência de sorovares de *Salmonella* ao longo dos anos é um reflexo do desafio contínuo que a produção avícola está enfrentando. Mudança nos esforços para controle, tais como a utilização de antibióticos ou nos produtos de sanitização, são mudanças necessárias.

A contaminação de frangos por *Salmonella* spp. pode estar relacionada com a forma com que estes são transportados. As aves normalmente são aglomeradas em caixas por longas distâncias em condições inadequadas no aspecto sanitário, aumentando, assim, o risco de contrair infecções cruzadas por salmonelas. As operações de abate e processamento das carcaças também contribuem para a disseminação e multiplicação das salmonelas, por meio da água de escaldagem, depenagem, contaminação cruzada de equipamentos e utensílios, manuseio inadequado durante o corte e evisceração e no acondicionamento até a sua comercialização.

Diante da globalização e da crescente conscientização dos consumidores, não apenas a indústria, mas toda a cadeia produtiva está se deparando com o desafio de produzir alimentos seguros, com qualidade, a preços competitivos e que ainda atendam aos novos hábitos sociais, econômicos e culturais das nações. Juntamente com todo o avanço tecnológico, especialmente dos meios de transporte e comunicação, evidencia-se claramente um incremento significativo do comércio internacional de alimentos nas últimas décadas, resultando em alongamento da cadeia de produção e conseqüente incorporação de novos riscos ao processo, particularmente relacionados à multiplicação de microrganismos patogênicos.

Há ainda a exposição crescente de um maior número de pessoas a um mesmo perigo, imprimindo uma característica de amplitude geográfica de veiculação importante às doenças transmitidas por alimentos. Desta forma, além da importância indiscutível das doenças transmitidas por alimentos sob o ponto-de-vista de segurança alimentar e suas implicações sociais e econômicas para o país, o Brasil preocupa-se com patógenos que possam representar barreiras potenciais à comercialização de seus produtos de origem animal e suas conseqüências diretas e indiretas.

As perspectivas de continuidade de pesquisa neste contexto tem relação com métodos de quantificação, uma ferramenta indispensável para a criação de programas governamentais de controle de patógenos dentro da cadeia produtiva de produtos de origem animal, principalmente para avaliar, quantificar e minimizar o risco de incidência de *Salmonella* spp na tecnologia de abate de frangos de corte.

O uso de métodos quantitativos no monitoramento dos níveis de contaminação e dos riscos microbiológicos presentes ao longo cadeia produtiva é essencial para conhecimento dos pontos críticos de contaminação por *Salmonella* desde as granjas até os cortes e carcaças de frangos, resfriados ou congelados. A quantificação de *Salmonella* spp. permite a revisão de medidas de controle de qualidade nas empresas e a verificação do efeito de cada medida adotada, mesmo que ela não seja totalmente eficaz e a adoção de novas estratégias, pois indica os pontos críticos para a contaminação e multiplicação deste patógeno ao longo da linha de abate.

## 6. REFERÊNCIAS

1. BOROWSKY, L.M. *Comparação de dois métodos de quantificação de Salmonella sp. em embutidos suínos*. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFRGS. Porto Alegre. 2005. 24 p.
2. BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. *Ciência Rural*, v. 40, n. 11, p.2338-2342, 2010.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 78, de 3 de novembro de 2003. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Galinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 05, nov. 2003, Seção 1, Pág. 3.
4. BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa n. 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus, 2003. *Diário Oficial da União* de 10 out. 2003, seção 1, p. 9.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento para os padrões microbiológicos em alimentos e seus anexos I e II. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n.7-E, p.45-53, 10 jan. 2001, Seção 1.
6. BRASIL. Resolução RDC nº 13 de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento Técnico para instrução de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados.
7. COLLA, F.L., MION, L., PARIZOTTO, L., BORTOLI, A.C., RODRIGUES, L.B., OLIVEIRA, E.R., SANTOS, L.R. *Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de amostras de Salmonella spp. isoladas de carcaças suínas*. XX Mostra de Iniciação Científica, Passo Fundo, RS. 2011.
8. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC) 2007. *Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk management (MRM) CAC/GL 63-2007*.
9. DICKEL, E. L. *Utilização da técnica Microbiológica Convencional, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de Salmonella em carcaças de frango para controle higiênico-sanitário do processo de abate*. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

10. ESCARTIN, E. F. Incidence and level of *Salmonella* serovars in raw pork obtained from Mexican butcher shops. *Food Microbiology*, v.12, 1995, p.435-439.
11. FORSYTHE, S. J. *Microbiologia Da Segurança Alimentar*. Trad. de M. C. M. Guimarães.; C. Leonhardt. Rev. de E. C. Tondo. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p.
12. FRAVALO, P.; HASCOET, Y.; LE FELLIC, M.; QUEGUMER, S.; PETTON, J.; SALVAT, G. 2003. *Convenient method for rapid and quantitative assessment of Salmonella enteric contamination: the mini-MSRV MPN technique*. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 2003, 11(2): 81– 88.
13. FREITAS, E. I.; LEMOS, A. A.; MARIN, V. A. *Validação de métodos alternativos na detecção de patógenos alimentares*. *Ciência & saúde coletiva*. Rio de Janeiro. v. 11, n. 7, 2006, p. 1073-1083.
14. GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Varela, 2003, 655p.
15. GIORDANO, L. *Tecnologia per la produzione industrial e dicotolette dipollo*. *Eurocarni*, n.3, 2004.
16. GRIMONT, PAD.; WEILL FX. *Antigenic formulae of the Salmonella serovars* 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris, France, 2007.
17. HUYS, G.; D'HAENE, K.; ELDERE, J.V.; HOLY, A.; SWINGS, J. *Molecular diversity and characterization of tetracycline-resistant Staphylococcus aureus isolates from a poultry processing plant*. *Applied Environmental Microbiology*, v.71, p.574–579, 2005.
18. IZAT, A. L.; KOPEK, J. M.; MCGINNIS, J. D. *Incidence, number and serotypes of Salmonella on frozen broiler chickens retail*. *Poultry Science*, v. 70, p.1438-1440, 1991.
19. JAKABI, M. et al. *Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de Salmonella sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997*. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, V.58, n. 1, p. 47-51, 1999.
20. JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005, 712p.
21. JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*, New York: Chapman & Hall, 1996, 661p.
22. LANA, G. R. Q. *Avicultura*. 1. ed. Recife: Rural Editora e Livraria, 2000, 268p.
23. McCrady, M.H. *The numerical interpretation of fermentation tube results*. *J Infect Dis*. 1915, (17): 183–212.



24. MARQUEZI, M. C. *Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água*. 2010. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.
25. NASCIMENTO, V. P. et al. Salmoneloses paratíficas: uma revisão e situação atual. In: Simpósio técnico de produção de ovos. APA, 6., São Paulo, 1996, p.93-116.
26. OLIVEIRA, G. *Avaliação de pontos críticos de contaminação por Salmonella sp. no processo de fabricação de farinha de vísceras, destinadas à fabrica de rações para aves*. 2000. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
27. PAVIC, A; GROVES, P. J.; BAILEY, G.; COX, J. M. A validated miniaturized MPN method, based on ISO 6579:2002, for the enumeration of *Salmonella* from poultry matrices. *Journal of Applied Microbiology*. n.109, p.25-34, 2010.
28. PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. São Paulo, Ed. 2, Pearson, 2005.
29. POPOFF, M. Y.; LEMINOR, L. *Antigenic Formulas of Salmonella Serovars.7<sup>a</sup> Revision*. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institute Pasteur, Paris, France, 1997.
30. SANTOS, L. A. G.; PINTO, P. S. A.; MORAES, M. P.; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUA, P. D.; PINTO, M. S.; DIAS, F. S. *Pesquisa Molecular e Convencional de Listeria monocytogenes para o controle de qualidade de carne suína*. Ceres. Minas Gerais. v. 53, n. 308, 2006, p. 481-486.
31. SANTOS, L. R. *Fagotipagem e Análise por RAPD/PCR (DNA polimórfico amplificado ao acaso) de amostras de Salmonella Enteritidis isoladas de materiais de origem avícola e de alimentos e humanos envolvidos em casos de toxinfecções alimentares*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001, p.178.
32. SILVA, J. A.; SOARES L. F.; COSTA, E. L. Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão. *Revista Tec Carnes*. Campinas, SP, v.3, n.1, p.19-26, 2001.
33. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S; GOMES, R.A.R. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*, 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Varela, 2007, p.61-62.
34. SKOVGAARD, N. Current topics in food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 99, p.107–111.

35. THOMAS, C. J.; McMEEKIN, T. A. Contamination of broiler carcass skin during commercial processing procedures: an electron microscopic study. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 40, n. 1, July, p.133-144, 1980.
36. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. *Food safety and foodborne illness*. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: dezembro de 2013.