

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Ocorrência, Contagem e Resistência Antimicrobiana de *Salmonella* Isoladas de Carcaças de Frangos Resfriadas e Pesquisa de *Salmonella* em Galpões de Frangos de Corte.

Autora: Anderlise Borsoi

**Dissertação
apresentada como
requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Ciências Veterinárias
na área de Medicina Veterinária
Preventiva.**

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

**PORTO ALEGRE
2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Ocorrência, Contagem e Resistência Antimicrobiana de *Salmonella* Isoladas de Carcaças de Frangos Resfriadas e Pesquisa de *Salmonella* em Galpões de Frangos de Corte.

**Autora: Anderlise Borsoi
Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento**

**PORTO ALEGRE
2005**

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos aos amigos e profissionais que tornaram este trabalho possível, mais simples, agradável de ser desenvolvido e útil à comunidade avícola. Obrigada a

meu orientador, Vladimir Pinheiro do Nascimento;

mestre Obiratã Rodrigues, Lenir, Carina e Cristina do CDPA-UFRGS, Garibaldi / RS, onde realizei a parte experimental do projeto;

professora Suzana Cardoso, Setor de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal / UFRGS;

professora Vânia Tronco (MADASA / Brasil);

gerentes, veterinários e técnicos do fomento das empresas avícolas que participaram desta pesquisa e

meus amigos Iriane e Ronaldo.

Em especial agradeço às pessoas que mais amo e que sempre estão ao meu lado, meus pais Thiago e Ana, meus irmãos Maiquel e Erivel. Agradeço por vocês me respeitarem, confiarem no meu trabalho e sempre acreditarem que posso ser melhor. Muito obrigada.

“Àquele que sempre está presente”, muito obrigada.

Ocorrência, Contagem e Resistência Antimicrobiana de *Salmonella* Isoladas de Carcaças de Frangos Resfriadas e Pesquisa de *Salmonella* em Galpões de Frangos de Corte.

Anderlise Borsoi

Aprovada em 15 de setembro 2005.

APROVADO POR:

Professor Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Professor Dr. Elci Lotar Dickel
Membro da Comissão

Professor Dr. Guiomar Pedro Bergmann
Membro da Comissão

Professora Dra. Luciana Ruschel dos Santos
Membro da Comissão

RESUMO

A *Salmonella* permanece um importante problema na avicultura mundial e considerando os patógenos transmitidos por alimentos, a *Salmonella* aparece como um dos agentes principais em surtos de toxinfecções alimentares. Existem vários relatos de isolamento de *Salmonella* em frangos vivos e surtos alimentares, porém em carcaças de frangos e cortes a disponibilidade de dados é menor, assim como estudos de determinação do número de *Salmonella* presentes nas amostras, também são poucos. No presente estudo, foram analisadas 180 carcaças de frangos resfriadas, adquiridas em varejos, para determinação da ocorrência de contaminação por *Salmonella* pelo método de microbiologia convencional, ensaio imunoenzimático (ELISA) e determinação do número de células da bactéria pelo método do número mais provável (NMP) nos ágar para isolamento verde brilhante com novobiocina (BGN) e xilose-lisina tergitol 4 (XLT4). Neste mesmo estudo, foi determinado o perfil de resistência a antimicrobianos de 13 amostras de *Salmonella* isoladas das carcaças de frangos, e analisados 101 suabes de arrasto de camas aviárias, pelo método microbiológico convencional, para a presença do agente. Os resultados mostraram 15,8% de ocorrência de *Salmonella* nos suabes de arrasto e 12,2% de ocorrência nas carcaças de frangos resfriadas, pelo método de microbiologia convencional. O teste de ELISA detectou 11,3% de positividade para *Salmonella* nas carcaças de frangos resfriadas. A média de NMP de *Salmonella* por mL, na leitura pelo ágar XLT4 foi de 2,674 células e BGN foi de 1,282 células. As cepas de *Salmonella* apresentaram resistência aos antimicrobianos lincomicina, penicilina e estreptomicina (100%), josamicina e enrofloxacina (69,23%), amoxicilina (30,76%), clortetraciclina (23,07%), estreptomicina e estreptomicina + penicilina (15,83%) e 7,69% de resistência a doxiciclina e polimixina B. Os sorovares de *Salmonella* isolados no estudo foram Enteritidis, Agona, Rissen, Heidelberg e Livingstone, nas carcaças de frangos, e, Enteritidis, Agona, Ohio, Rissen, Tennessee, entérica O: 3,10 e entérica O: 6,71 nos suabes de arrasto. A análise dos resultados apresentou contaminação por *Salmonella* nas camas aviárias e presença de cepas de *Salmonella*, isoladas das carcaças, multiresistentes a antimicrobianos. Também demonstrou existir um número variável de células de *Salmonella* contaminando as carcaças de frango resfriadas que estão à venda ao consumidor.

ABSTRACT

Salmonella in poultry remains an important worldwide problem, and among foodborne pathogens, the *Salmonella* appears one of the most important outbreaks agents. There are many *Salmonella* isolation reports on poultry related samples and outbreaks, however *Salmonella* reports in poultry carcasses and pieces are fewer, as well as, researches about quantification of *Salmonella* in samples are rare. In this study, 180 refrigerated broiler carcasses, obtained from local stores, were assessed by conventional microbiological method and an immunoenzymatic assay (ELISA) to recover *Salmonella*, and by the most probable number (MPN) method to quantify bacterias cells onto brilliant green agar with novobiocin (BGN) and xylose lysin tergitol 4 agar (XLT4). In the same study, 13 *Salmonella* strains isolated from refrigerated broiler carcasses had their antibiotic resistance verified, and 101 litter drag swabs were analyzed by conventional microbiological method to *Salmonella* isolation. The results showed 15,8% occurrence of *Salmonella* by litter drag swab and 12,2% by conventional microbiological method from refrigerated broiler carcasses. In the ELISA test, 11,3% samples were *Salmonella*-positive. The MPN per mL rates was 2,674 cells on XLT4 agar and 1,282 cells on BGN agar plate. The *Salmonella* strains showed antimicrobial resistance to lincomycin, penicillin and streptomycin (100%), josamycin and enrofloxacin (69,23%), amoxicillin (30,76%), chlortetracyclin (23,07%), streptomycin and streptomycin+penicillin (15,83%) and 7,69% resistance to doxicyclin and polymixin B. The serovars isolated were Enteritidis, Agona, Rissen, Heidelberg and Livingstone from broiler carcasses, and Enteritidis, Agona Ohio, Rissen, Tennessee, enterica O: 3,10 and enterica O: 6,71 from drag swabs. Results analysis showed *Salmonella* contamination on poultry houses and multiple antimicrobial-resistant *Salmonella* strains isolated from broiler carcasses. The results also showed that could be a variable cells number contaminating refrigerated broiler carcasses, which have been selling to consumer's

SUMÁRIO

RESUMO	02
ABSTRACT	03
1 INTRODUÇÃO	06
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	08
2.1 O Gênero <i>Salmonella</i>.....	08
2.2 Importância da <i>Salmonella</i> em Saúde Pública.....	09
2.2.1 <i>Salmonella</i> um Microrganismo Cosmopolita.....	09
2.2.2 Infecção em Humanos	14
2.2.2.1 Dose Infectante	14
2.2.2.2 Patogenia em Humanos	15
2.2.3 Microbiologia e Ocorrência de <i>Salmonella</i> em Carcaças de Frangos.....	16
2.2.3.1 Microbiologia da Carcaça de Frangos.....	16
2.2.3.2 Ocorrência de <i>Salmonella</i> em Carcaças de Frangos.....	17
2.2.4 <i>Salmonella</i> Isoladas de Carcaças de Frangos e Resistência a Antimicrobianos.	20
2.2.5 Comportamento de <i>Salmonella</i> em Alimentos Frente ao Estresse Térmico.....	22
2.2.6 Contaminação Cruzada por <i>Salmonella</i> nos Alimentos.....	23
2.2.6.1 Preparação, Estoque e Consumo.....	24
2.2.6.2 Descongelamento.....	25
2.2.6.3 Manipulação de Produtos Crus.....	25
2.2.6.4 Cocção.....	25
2.2.6.5 Congelamento e Reaquecimento.....	26
2.3 <i>Salmonella</i> na Criação e em Carcaças de Frangos.....	27
2.4 Diagnóstico de <i>Salmonella</i> em Aves e Produtos Derivados.....	28
2.4.1 Teste Microbiológico Convencional.....	28
2.4.1.1 Teste de Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	29
2.4.2 Diagnóstico Bacteriológico por Suabe de Arrasto de Cama Aviária.....	31
2.4.3 Utilização da Técnica de Numero Mais Provável (NMP).....	32
2.5 Suscetibilidade Antimicrobiana.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Amostragem Utilizada e Local de Realização das Análises.....	35

3.1.1	Obtenção das Carcaças de Frangos.....	35
3.1.2	Obtenção dos Suabes de Arrasto.....	35
3.2	Metodologias Utilizadas.....	36
3.2.1	Metodologia Utilizada no Suabe de Arrasto.....	36
3.2.2	Metodologia Utilizada para Determinação do NMP.....	37
3.2.3	Metodologia Utilizada na Técnica de ELISA.....	38
3.2.4	Metodologia Utilizada para Determinação do Perfil Antimicrobiano.....	39
3.3	Análise dos Dados.....	40
4	RESULTADOS.....	40
4.1	Ocorrência de <i>Salmonella</i> nos Suabes de Arrasto.....	40
4.2	Pesquisa de <i>Salmonella</i> nas Carcaças de Frangos.....	41
4.3	NMP de <i>Salmonella</i> nas Carcaças de Frangos.....	42
4.4	Resultados da Avaliação dos Kits para ELISA – SALVIA.....	44
4.5	Sorovares de <i>Salmonella</i> Identificados.....	45
4.6	Perfil de Resistência a Antimicrobianos das Salmonelas Isoladas de Carcaças de Frangos.....	46
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	ANEXO A – Tabela NMP/mL e cálculo de NMP/carcaça.....	65
	ANEXO B – Resumos Apresentados no XVII Congresso Latinoamericano de Microbiología y X Congresso Argentino de Microbiologia. 17 - 21 de Outubro de 2004. Buenos Aires, Argentina.....	68
	ANEXO C – Resumos Publicados no Suplemento 7 da Revista Brasileira de Ciência Avícola. Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologia Avícolas. 4 - 7 Maio de 2005. Santos, São Paulo.....	71
	ANEXO D – Declarações dos Trabalhos Apresentados Oralmente na Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologia Avícolas. 4 - 7 Maio de 2005. Santos, São Paulo.....	74
	ANEXO E – Resumo Apresentado na MOSTRA UFRGS / INOVA UFRGS. 10-14 Maio de 2005. Porto Alegre / RS.....	77

1 INTRODUÇÃO

Em 2004, a avicultura brasileira destacou-se frente aos grandes produtores mundiais. O País fechou o ano com uma produção recorde de 8,5 milhões de toneladas de carne de aves, dos quais 2,4 milhões de toneladas foram para a exportação, gerando uma receita de 2,5 bilhões de dólares. O Brasil, pelo segundo ano consecutivo, é o primeiro exportador mundial, sendo que de setembro de 2003 a setembro de 2004, foram exportados 2,45 milhões de toneladas de carne de frango.

A carne é um dos alimentos de maior nível nutritivo para o consumo humano, não apenas como fonte de proteína de alta qualidade, mas também minerais e vitaminas. O consumo *per capita* de carne varia entre países, pois diferenças econômicas, questões religiosas e recursos naturais estão envolvidos. No Brasil, o consumo *per capita* de carne de frango em 2004, atingiu a marca aproximadamente 34 quilos, com previsão de crescimento de 5% para o ano de 2005 (UBA, 2005).

A expansão da avicultura, no Brasil e no mundo, aumentou exponencialmente a quantidade de animais, concentrando-se mais aves por metro quadrado, situação que favorece a instalação e multiplicação de agentes patogênicos. Dentre estes, o agente *Salmonella* permanece um problema importante na avicultura mundial, seja do ponto de vista de saúde animal ou saúde humana.

Considerando os problemas de doenças transmitidas por alimentos, a *Salmonella* aparece como um dos agentes mais importantes em surtos de toxinfecções alimentares. Governos de diversos países adotaram programas a fim de melhorar o nível de segurança alimentar, exemplos podem ser citados em países como a Dinamarca, Suécia, Finlândia, Estados Unidos da América e Reino Unido, que adotaram controles rígidos para redução de salmonelas em todos os níveis da cadeia alimentar (LAKE et al., 2002).

O Brasil tem seus esforços concentrados no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) que visa à manutenção do status sanitário dos plantéis avícolas e no Programa de Redução de Patógenos, instituído pelo Governo Federal em outubro de 2003, visando à inocuidade dos alimentos, mediante o controle do sistema de produção (BRASIL, 2003).

A avaliação microbiológica de alimentos é assunto de interesse desde o início da microbiologia como ciência.

Esta avaliação constitui-se em um dos parâmetros mais importantes para determinar-se qualidade e sanidade dos alimentos, e é igualmente importante para verificação de padrões e especificações microbiológicas nacionais e internacionais (SILVA, 1998). Pesquisas que relatam incidência, prevalência e sorovares de *Salmonella* em carcaças de frangos estão disponíveis e contam com dados coletados em diferentes países (SIMMONS et al., 2003), contudo, estudos que forneçam dados quantitativos, isto é, proporcionem o conhecimento da extensão de contaminação pelo patógeno em carcaças ou partes de frangos são pouco freqüentes (IZAT et al., 1991b).

No contexto de status sanitário dos plantéis avícolas e busca de inocuidade dos alimentos este trabalho foi elaborado e desenvolvido. O presente estudo objetivou verificar a presença de *Salmonella* em carcaças de frangos resfriadas por um método de ensaio imunoenzimático (ELISA), usando kit comercial SALVIA (Tecra[®] *Salmonella* VIA) e estimar o número de células de salmonelas pelo método do Número Mais Provável (NMP). Também teve como objetivos a identificação da ocorrência de salmonelas em plantéis avícolas da região onde o trabalho foi realizado, pelo método de suabes (*swab*) de arrasto e determinar a resistência a antimicrobianos de *Salmonella* spp. isoladas das carcaças de frangos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Gênero *Salmonella*

A *Salmonella* é um microrganismo que está amplamente distribuído no ambiente. Este gênero que obteve seu nome inspirado no cientista que o descobriu, Dr. Daniel E. Salmon (SNOEYEMBOS, 1984), hoje é composto por mais de 2500 sorovares diferentes e dentre estes, cerca de 80 a 90 sorovares são os mais comuns em casos de infecção dos seres humanos e animais (BERCHIERI, 2000).

A primeira descrição de uma bactéria considerada do gênero *Salmonella* foi realizada por Ebert em 1880, isolada de baço e linfonodos de humanos e designada como *Bacterium typhosa*, responsável pela febre tifoide. Em 1885, outro membro do gênero foi isolado a partir de suínos por Smith e Salmon, sendo denominado de *Bacillus cholerae suis*, e foi erroneamente denominado como peste suína. Gärtner, em 1888, isolou o *Bacillus enteritidis*, de um jovem com gastroenterite (BARROW, 1993).

Os membros do gênero *Salmonella* são bacilos curtos, de 0,7-1,5 x 2-5 µm, Gram negativos e não esporulados. Os sorovares Gallinarum e Pullorum são imóveis e os sorovares móveis possuem flagelos peritríquios. São bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, apresentam crescimento entre 5 e 45°C, porém seu crescimento ótimo ocorre em 37°C. Crescem em pH entre 4 e 9, sendo pH 7 o ideal. As colônias, de 2-4 mm, apresentam-se elevadas e com bordas lisas e arredondadas, fazendo-se necessário fonte de carbono e nitrogênio nos meios de cultura (HOLT, 1994; GAST, 1997)

A classificação do gênero *Salmonella* proposta por Popoff e Le Minor (1997) consiste de duas espécies: *S. entérica* e *S. bongori*. A *Salmonella enterica* dividida em seis subespécies: enterica, arizonae, diarizonae, salamae, houtenae e indica; e a *S. bongori* em 20 subespécies, sendo as espécies e subespécies chamadas em geral de sorovares ou sorotipos de *Salmonella*.

Os grupos ou espécies são identificados por análise antigênica, embora as características bioquímicas sejam utilizadas na detecção. As salmonelas como outras enterobactérias, possuem antígenos somáticos (O) e antígenos flagelares (H) em uma ou ambas fases (1 e 2). O antígeno O permite separar a *Salmonella* em grupos sorológicos, que recebem letras do alfabeto como A, B, C₁ e D₁ para denominação.

Poucas salmonelas têm antígenos de envoltório K, denominados Vi, que interferem na aglutinação por anti-soros O e estão associados à sua capacidade de invasão. As provas de aglutinação com anti-soros adsorvidos, para antígenos O e H diferentes, formam a base da classificação sorológica das salmonelas (POPOFF; LE MINOR, 1997; GAST, 1997).

A realização da classificação sorológica pelo esquema de Kauffmann-White segue uma tabela de fórmulas antigênicas, que indica a ordem dos fatores O, Vi e H nas fases 1 e 2. A interpretação é procedida pela leitura dos antígenos somáticos, primeiramente, seguido do antígeno envoltório, este podendo estar presente ou não, então, descrito entre colchetes. Após os dois pontos, indica-se os antígenos flagelares nas fases 1 e 2, sendo que se não houver este, deve-se representar por um traço. Para exemplificar, a fórmula antigênica para *Salmonella* Typhi descreve-se do seguinte modo: 9,12,[Vi]: d : - (LE MINOR ; VERÓN, 1982).

Para efeitos de classificação mais detalhada, estuda-se a divisão em fagotipos, estabelecendo sistemas de tipificação. Deste modo, é possível se determinar o predomínio de certos fagotipos em uma região ou país para, mediante estudos epidemiológicos, orientar-se a profilaxia (COX, 1988 *apud* FLORES, 2001).

2.2 Importância da *Salmonella* em Saúde Pública

2.2.1 *Salmonella* um Microrganismo Cosmopolita

A toxinfecção humana devido à ingestão de produtos alimentícios contaminados por *Salmonella* tem registros que datam do final do século passado. Muitos casos de toxinfecções humanas por *Salmonella* Agona (*S. Agona*) na Europa e Estados Unidos foram associados à ingestão de produtos alimentícios de origem avícola (BERCHIERI, 2000). Os sorovares mais associados às infecções alimentares são *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) e *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*). Os primeiros registros, em humanos, de *S. Enteritidis*, datam de 1888 em Frankenshausen, Alemanha (ROBBS; ROBERTS, 1999 *apud* TESSARI et al., 2003).

Durante onze anos, período de 1978-1988, foi relatada a presença de *S. Enteritidis* em 5,45% dos 118.685 isolados de *Salmonella* a partir de humanos e 2,65% dos 3.315

isolados a partir de alimentos na Itália. No mesmo período, a *S. Enteritidis* foi relatada em 7,4% dos 568 isolados de *Salmonella* em ovos e aves. Nestes anos, à exceção de 1982 e 1983, a *S. Enteritidis* estava na lista dos cinco sorotipos mais freqüentemente isolados de humanos (FANTASIA et al., 1991). Ainda na Itália, dados relativos ao período de 1982-1992, mostram que a *S. Enteritidis* isolada a partir de humanos aumentou de 2,4% para 57,1% e a partir das amostras de alimentos, aumentou de 0,5% para 22,8% (FANTASIA; FILETICI, 1994).

A situação epidemiológica da Polônia, estudada durante 1961-1991, apresentou ocorrências de *S. Enteritidis* nestes trinta anos. De 1987 a 1991 um grande número pessoas adoeceram devido a surtos de infecções alimentares e foram hospitalizadas. Durante os anos de 1975 -1991 a porcentagem de participação da *Salmonella* aumentou de 35,7% para 91,3% frente às outras bactérias envolvidas em surtos alimentares. O aumento da ocorrência do sorovar *S. Enteritidis* de 1962 -1991 foi de 93,8%, enquanto os sorovares *S. Typhimurium*, *S. Agona* e outros apresentaram um decréscimo nas infecções em humanos (GLÓSNICKA; KUNIKOWSKA, 1994).

No Canadá, a prevalência de *S. Enteritidis* em humanos aumentou de 9% para 12% dos isolados de *Salmonella*, nos anos de 1989 a 1991. Com exceção da *S. Enteritidis* fagotipo (PT) 4, que não foi isolada de aves no Canadá, os fagotipos de ocorrência mais comum em aves (PT 8, 13 e 13_a) também são os mais prevalentes em humanos. A razão para o incremento da prevalência de *S. Enteritidis* em pessoas é multifatorial; contudo, aves são consideradas uma importante fonte de infecção (POPPE, 1994).

Dados de 2001 da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), revelam fagotipos 4, 4a, 6, 7 e 8 de *S. Enteritidis* identificados no Brasil em fonte animal. De acordo com Santos et al. (2003) os fagotipos de *S. Enteritidis* identificados no Rio Grande do Sul em material avícola foram PT 4, 4a, 6a, e 7, enquanto que em carcaças de frangos foram identificados os PT 4 e 4a.

A *Salmonella* é o mais eficiente agente causador de toxinfecções alimentares nos Estados Unidos da América (EUA). Em dados de isolamento de *Salmonella*, o sorovar *Enteritidis* aumentou até 1996, ao passo que um declínio nas *S. Hadar* e *Salmonella* Heidelberg (*S. Heidelberg*) foi notado. Dados de 2001 apresentam a *S. Enteritidis* em

fontes humanas como o segundo sorovar mais freqüente, nono lugar em amostras clínicas não humanas e oitavo lugar nas amostras não-clínicas não humanas (Tabela 1).

Tabela 1 Os vinte sorovares mais freqüentemente isolados de *Salmonella* em amostras humanas e amostras clínicas e não-clínicas não humanas em 2001.

Colo Cação	Fonte Humana		Fonte Clínica Não Humana		Fonte Não-Clínica Não Humana	
	Sorovar	%	Sorovar	%	Sorovar	%
1	Typhimurium	22.1	Typhimurium		Heidelberg	23.5
2	Enteritidis	7.7	Newport	13.6	Typhimurium	14.1
3	Newport	10.0	Heidelberg	6.0	Montevideo	6.2
4	Heidelberg	5.9	Agona	5.0	Choleraesuis	5.9
5	Javiana	3.4	Senftenberg	3.9	Senftenberg	5.7
6	Montevideo	2.0	Choleraesuis	3.5	Agona	3.9
7	Oraniemburg	1.9	Muenster	2.8	Muenster	3.1
8	Muenchen	1.8	Montevideo	2.6	Enteritidis	2.6
9	Thompson	1.6	Enteritidis	2.2	Derby	2.6
10	Saintpaul	1.5	Dublin	2.0	Hadar	2.5
11	Java	1.5	Derby	2.0	Anatun	2.1
12	Infantis	1.4	Anatun	2.0	Newport	1.8
13	Braenderup	1.2	Infantis	1.9	Mbandaka	1.7
14	Agona	1.2	Kentucky	1.5	Infantis	1.7
15	Typhi	1.1	Uganda	1.2	Schwarzengrund	1.5
16	Mississippi	1.1	Bredeney	1.1	Oraniemburg	1.4
17	Berta	1.0	Muenchen	0.9	Berta	1.3
18	Poona	1.0	Hadar	0.9	Worthington	1.1
19	Hadar	1.0	Mbandaka	0.9	Cerro	1.0
20	Bareilly	0.6	Cerro	0.9	LIVINGSTONE	1.0
Total		79.0		83.2		84.5

Fonte: CDC, 2004.

Informações sobre a idade dos pacientes, apontam que as faixas etárias mais atingidas pelas toxinfecções foram crianças e jovens de 1-19 anos, com 33% dos isolados e adultos de 20-49 anos, com 34% dos isolados. Em 1996, o USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) implementou regras para a redução de patógenos nos alimentos, através do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), e como resultado, notaram um decréscimo nas doenças em humanos (OLSEN et al., 2001). No mesmo sentido, o governo dos Estados Unidos, através do USDA, estabeleceu normas que prevêm a redução da ocorrência de patógenos que representem perigo à saúde

humana, em especial salmonelas, em produtos finais de origem avícola. Esta regulamentação, chamada *Mega Reg*, estabelece metas de redução da presença destes agentes, ao longo de um período determinado, em alimentos produzidos pelas empresas que se submeterem ao programa (NASCIMENTO, 2003).

O Chile tem sido afetado por uma extensa epidemia de infecções por *S. Enteritidis*, desde 1994, cuja ocorrência aumentou 3000% frente a baixas taxas das épocas anteriores. Os primeiros casos foram registrados ao norte do país e três a quatro anos mais tarde haviam se disseminado por todo território chileno. Até agora, as razões para a emergência da *S. Enteritidis* não estão claras. Os isolados de fagotipos no Chile sugerem uma contaminação dos estabelecimentos avícolas por *S. Enteritidis* advinda de fontes externas. Tal fato pode ter ocorrido pela entrada de aves destinadas à reprodução importadas da Europa, EUA ou Brasil. Os estudos epidemiológicos chilenos, encontraram concordância entre os fagotipos de interesse no meio clínico com os fagotipos identificados em amostra de alimentos ligados a surtos e em produtos avícolas (PRAT et al., 2001).

Assim como em outros países, na Argentina também houve um aumento do sorotipo *Enteritidis*, desde 1986. Entre 1986 e 1993 foram relatados 150 surtos de toxinfecções alimentares por *S. Enteritidis*, afetando 6230 pessoas, as quais apresentaram sintomas agudos de febre, vômitos, diarreia e desidratação; muitos destes casos necessitaram de internação hospitalar (CAFFER; EIGUER, 1994).

Durante 30 anos de estudos realizados no Brasil (1962-1991), foram analisados os sorotipos de *Salmonella* isolados de aves, oriundas de algumas áreas avícolas do país. A classificação dos sorovares foi procedida de acordo com três fases, compreendidas entre 1962 e 1991 (Tabela 2). Dentre os sorovares classificados como “muito freqüentes” e “freqüentes”, 87% dos isolados estavam representados pelos sorotipos cosmopolitas (HOFER et al., 1997).

Mota et al. (1983) descreveu o primeiro surto de *S. Enteritidis* ocorrido no Brasil, porém foi a partir de 1993 que a *S. Enteritidis* emergiu como um grande problema de saúde pública. Até 1990 a *S. Enteritidis* era raramente encontrada em infecções humanas, mas passou a corresponder a mais de 60% dos sorovares isolados no Instituto Adolfo Lutz em 1995 (SILVA; DUARTE, 2002).

Tabela 2 Classificação da frequência de detecção dos sorovares de *Salmonella* de acordo com os três períodos compreendidos entre os anos de 1962 e 1991.

Períodos	Muito Frequentes	Frequentes	Comuns mas não frequentes
1962-1971 (n=224)	Pullorum Gallinarum Derby	Oraniemburg Typhimurium Anatum	Muenster Montevideo S. 1 4 1 Saint Paul
1972-1981 (n= 438)	Pullorum Gallinarum	Derby Oraniemburg Typhimurium Enteritidis	Agona Anatum Newlands Kentuck Tennessee Give Borbeck Godesberg
1982-1991 (n= 1453)	Typhimurium Gallinarum Heidelberg Enteritidis Infantis Pullorum Hadar	Saint Paul Senftenberg Newlands Newport S. 11,4,12 Anatum Tennessee Agona Schleissheim Cerro S. III 18:Z ₄ , Z ₃₂ Give	Mbandaka Chester Montevideo Derby Muenster Stanley Bredney Havana Oraniemburg Orion

Fonte: Hofer et al., 1997.

No Estado do Rio Grande do Sul entre 1994 e 1995, houve um incremento nos casos de toxinfecções alimentares noticiados pela imprensa de Porto Alegre com suspeita clínica de salmonelose, sempre associado à ingestão de produtos de origem avícola ou de alimentos preparados com ovos, como a maionese caseira (SANTOS, 2001). Estudos de surtos alimentares durante 1997 e 1999, revelaram que 35,7% das ocorrências investigadas foram causados por *Salmonella* spp, e, adultos de 16 a 50 anos de idade foram os mais afetados em mais de 50% dos casos (COSTALUNGA; TONDO, 2002).

2.2.2 Infecção em Humanos

Devido à alta prevalência de *Salmonella* em aves, os produtos avícolas aparecem como fontes comuns de transmissão da bactéria a humanos. A salmonelose em humanos freqüentemente ocorre devido ao consumo de carne de aves e ovos mal cozidos (POPPE, 1996), embora o número e a variedade de alimentos envolvidos no aparecimento de surtos de infecções por *Salmonella* seja grande (FRASIER; 1993).

A salmonelose em pessoas é influenciada por uma série de fatores que incluem o sorovar de *Salmonella* envolvido, idade e dose infectante, tipo de alimento contaminado e predisposição para doenças, dentre outros (POPPE, 1996). Entre os fatores que contribuem para a resistência contra as salmoneloses, estão: acidez gástrica, flora microbiana intestinal normal e imunidade intestinal local (JAWETZ et al., 1984), além da motilidade do trato gastro intestinal.

2.2.2.1 Dose Infectante

A determinação exata da dose infectante de *Salmonella* em humanos não está em consenso entre os pesquisadores até o momento. Valores entre 10^1 - 10^8 células bactérias são reportados como causadores de infecções.

Poppe (1996) cita que há evidências de que 10^1 - 10^3 bactérias possam causar doenças em crianças, idosos, pessoas imunocomprometidas, especialmente se a bactéria estiver contaminando alimentos com alto teor gordura. Neste contexto, Horrox (1997) cita que na maioria dos surtos relatados a dose está ao redor de 10^3 microrganismos. Para Riedel (1992), o número está acima de 10^5 células e Jewetz et al. (1991) citam para humanos um mínimo de 10^5 a 10^8 salmonelas, dependendo do sorotipo, das condições da imunidade local e de outros fatores como acidez gástrica e a flora microbiana intestinal. Fehlhaber; Janetschke (1995) referem-se a dose de 10^2 a 10^6 células por grama de alimento ingerido como sendo suficiente para produzir infecção. Em testes com alimentos envolvidos em surtos, Blaser; Newman (1982), obtiveram quantidades inferiores a 10^3 salmonelas causando sinais clínicos evidentes da infecção (*apud* FLORES, 2001).

2.2.2.2 Patogenia em Humanos

A patogenia em humanos descrita por Jawetz et al. (1984) citam que no homem as salmonelas produzem, freqüentemente, formas mistas de doença, porém três são os tipos principais de enfermidades: as “febres entéricas”, bacteremia e enterocolites.

As “febres entéricas” são provocadas principalmente pelas *S. Thyphimurium* e *Salmonella* Schotmülleri. As salmonelas ingeridas atingem o intestino delgado e penetram nos linfáticos, que as transportam para a corrente sangüínea. Transportadas pelo sangue para diversos órgãos, assim as salmonelas se multiplicam no tecido linfóide e são eliminados nas fezes. Após um período de incubação de 10 a 14 dias, surge febre, mal-estar cefaléia, constipação, bradicardia, e mialgia. A febre atinge um platô elevado e há presença de esplenomegalia e hepatomegalia.

O segundo tipo de enfermidade, bacteremia com lesões focais, está comumente associada à presença de *Salmonella* Cholerasuis, contudo, pode ser causada por qualquer sorovar. Após a ingestão, ocorre invasão inicial da corrente sangüínea, com possíveis lesões focais nos pulmões, ossos e meninges dentre outros, mas as manifestações intestinais são freqüentemente ausentes.

O terceiro tipo de enfermidade, as enterocolites, são as manifestações mais comuns de infecção por salmonelas. Oito a 48 horas após a ingestão de salmonelas surgem náuseas, cefaléias, vômitos e diarréia profusa com poucos leucócitos e raramente com sangue. A febre baixa é comum e o episódio em geral melhora dentro de dois a três dias. São encontradas lesões inflamatórias no intestino grosso e intestino delgado. A bacteremia é bastante rara (2 a 4%), exceto em pessoas imunodeficientes. Bryan; Doyle (1994) citam que a diarréia pode persistir por duas semanas e a bactéria pode ser eliminada por metade dos pacientes atingidos durante duas a quatro semanas. Uma categoria secundária de complicações, inclui artrites pós-infecção, erupções cutâneas e desenvolvimento de síndrome de Reiter's (poliartrite periférica soronegativa, com duração mais longa do que um mês, manifestando-se geralmente após quadro infeccioso disentérico ou urogenital) (PLAUT, 2000; SOUSA et al., 2003).

A terapia antimicrobiana deve ser considerada no caso de pacientes com a doença em estado prolongado ou severo, e ainda, se este estiver sob o risco de transmitir a infecção

a outros, particularmente à pessoas imunocomprometidas. Os antimicrobianos em muitos casos prolongam o tempo de eliminação do agente, o que no caso de *Salmonella* é particularmente indesejável (PLAUT, 2000).

2.2.3 Microbiologia e Ocorrência de *Salmonella* em Carcaças de Frangos

A contaminação dos produtos avícolas, carnes e ovos para o consumo humano podem ocorrer devido às infecções intestinais e sistêmicas das aves, através do abate, processamento da carcaça, contato com superfícies contaminadas e mãos dos manipuladores durante a preparação dos alimentos, ou ainda, por contaminação cruzada (NASCIMENTO, 1996; SILVA, 1996). Estudos demonstram significativa proporção de carcaças e cortes de frangos contaminados por *Salmonella*, freqüentemente com baixo número de microrganismos. Contudo, em relação à carne de frango, está demonstrado que mesmo um pequeno número de animais inicialmente infectados pode causar a multiplicação destas ocorrências através da contaminação de toda uma linha de abate, representando uma ameaça à saúde pública em casos onde as carcaças não são processadas corretamente (NASCIMENTO, 1995).

2.2.3.1 Microbiologia da Carcaça de Frangos

A carga microbiana das carcaças de frango e seus derivados é representada por uma microbiota oriunda, principalmente, das aves vivas e outra parte incorporada em qualquer uma das etapas do abate ou processamento. A proporção de aves infectadas por *Salmonella* é variável, pois depende da alimentação e condições de criação das aves (SILVA, 1998). Deste modo, os frangos aparecem como fontes potenciais de *Salmonella* devido a sua contaminação inicial e subsequente inadequado cozimento, contaminação cruzada e resfriamento (BRYAN; DOYLE, 1995).

A microbiota inicial da carne é diversificada e parte dos microrganismos que alteram a carne fresca refrigerada, são bactérias psicrotóficas, dos gêneros *Pseudomonas* e *Moraxella* (*Acinetobacter*). Também presentes espécies anaeróbicas facultativas, como enterobactérias psicrotóficas *Aeromonas* sp., *Shewanella putrefacins* e microrganismos

gram-positivos como *Lactobacillus* sp. e *Brochothrix thermosphacta*. Da carne de aves podem ser isoladas bactérias mesófilas produtoras de toxinfecções alimentares como *Salmonella* sp., *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* sp.; *Escherichia coli* enterohemorrágica e ainda *Listeria monocytogenes*.

O mecanismo de contaminação da carcaça de aves, durante o processamento, envolve inicialmente a retenção das bactérias numa camada líquida sobre a pele, para que os microrganismos possam aderir-se convenientemente. A microbiota da ave viva se encontra essencialmente na superfície externa, espaço interdigital e tegumentos cutâneos, no trato digestivo e em menor grau no aparelho respiratório. Algumas espécies de *Salmonella* são capazes de aderir-se firmemente a fibras de colágeno da superfície externa da pele do frango, após a imersão em água. A adesão não depende de fímbrias, ocorrendo pelo contato da célula microbiana com a pele do frango, na presença de água. Nas operações de abate, constituem se pontos críticos de controle de *Salmonella* a depenação, evisceração, pré-resfriamento e o resfriamento das carcaças (SILVA, 1998).

2.2.3.2 Ocorrência de *Salmonella* em Carcaças de Frangos

A incidência de *Salmonella* em carcaça de frangos tem sido documentada e os dados têm importância internacional. Embora haja vários relatos de isolamento de *Salmonella* de frangos vivos, a incidência em carcaças, cortes, carne ou produtos fabricados a partir de carne de frango está disponível em menor número (Tabela 3).

Dufrenne et al. (2001), Holanda, concluem o estudo sobre *Salmonella* e *Campylobacter* tendo como resultados de incidência de *Salmonella* em frangos resfriados e congelados 13,5%.

Na Espanha Capita et al. (2003) citam incidências de *Salmonella* de 55% em carcaças inteiras, 40% em cortes e 40% em produtos a base de frango, totalizando 49% de prevalência entre as amostras analisadas.

No Brasil, poucos estudos a respeito de prevalência de *Salmonella* em carcaças de frangos foram publicados até o momento. Na cidade de Descalvado (São Paulo) foram analisadas 120 carcaças congeladas, de dois abatedouros distintos. O resultado obtido foi ausência *Salmonella* nas amostras em estudo (CARDOSO et al., 2000). Ainda em São

Paulo, porém no município de Jaboticabal, 150 carcaças congeladas foram analisadas e o percentual de positividade para *Salmonella* estabelecido foi 32% (SANTOS et al., 2000).

No Rio Grande do Sul, foi realizado um estudo para fagotipagem de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango congeladas, material biológico humano, alimentos e diferentes materiais de origem avícola, no qual dos 272 isolados de *Salmonella*, 111 tiveram como origem carcaças de frango congeladas (SANTOS et al., 2003).

Ainda no Rio Grande do Sul, NASCIMENTO et al. (1997) relatam a prevalência de *Salmonella* em carcaças e partes de frangos e os principais sorovares identificados. Positividade de 15,1% em carcaças e 26,1% no total das amostras de partes (coxinha da asa 25,6%, peito sem ossos 25,6%, coxa e sobre coxa 30,3% e dorso 31,0%). Os principais sorovares identificados foram *S. Enteritidis* (51.0%), *S. Hadar* (26.0%) e *S. Heidelberg* (11.0%).

Dickel (2004) avaliou o processo higiênico-sanitário de abate de frangos em três diferentes matadouros no Rio Grande do Sul, citando que 26,7% dos lotes que chegaram ao abate apresentaram-se positivos para *Salmonella* e as carcaças analisadas antes do *chiller* e depois do *chiller* apresentaram respectivamente 31,7% e 20% de positividade pelo método de microbiologia convencional. Os sorovares identificados na avaliação dos lotes de frangos e carcaças, foram: *S. Heidelberg* (63,9%), *S. Enteritidis* (31,9%), *S. Worthington* (2,1%) e *S. Tennessee* (2,1%). Em conclusão o autor cita que tais sorovares apresentam risco à saúde pública.

Tabela 3 *Salmonella* isolada a partir de frangos e amostras de produtos a base de frango a partir de retalhos em dezessete países no período de 1961-2001.

Referência	País	Tipo de amostra	Número de amostras	% de amostras positivas
Wilson et al., 1961	EUA	C, P e O	525	16.8
Woodburn, 1964	EUA	C, P e O	264	27.3
Wilder and McCready, 1966	EUA	C, P e O	237	50.2
Harris et al., 1968	EUA	Carcaça Int.	862	4.3
Não publicado, 1970	EUA	Não descrito	30	46.7
Não publicado, 1973	EUA	Não descrito	61	21.3
Ladiges and Foster, 1974	EUA	Carcaça Int.	36	8.2
Van Schothorst et al., 1976	Holanda	Carcaça Cong.	99	73.7
Duitschaeffer, 1977	Canadá	Partes	69	34.8
Swaminathan et al., 1978	EUA	Carne	41	7.3
Mercuri, et al., 1978	EUA	Carcaça Int.	240	51.2
Norberg, 1981	Suécia	Carcaça Cong.	82	1.2
Barrell, 1987	Reino Unido	Carne e osso	82	36.6
Bok et al., 1986	África do Sul	Carcaça int.	718	18.9
Barrel, 1987	Reino Unido	Carne e osso	78	28.2
Fukushima et al., 1987	Japão	Tecido	120	49.2
Hood et al., 1988	Reino Unido	Carcaça Int.	69	2.9
De Boer and Hahne, 1990	Holanda	C, P e O	81	54.3
Bokanyi et al., 1990	EUA	Carcaça e partes	142	43.0
Izat et al., 1991	EUA	Carcaça Int.	72	33.3
Roberts, 1991	Reino Unido	Resf./ Cong.	496	52.8
Vorster et al., 1991	África do Sul	Carcaça Int.	26	19.2
Castillo-Ayala et al., 1993	México	Carcaça Int.	70	68.6
Jerngklinchan et al., 1994	Tailândia	P e C	188	76.6
Scantling et al., 1995	EUA	Perus int.	72	50.0
Plummer et al., 1995	Reino Unido	Tecido	325	22.8
Arroyo and Arroyo, 1995	Espanha	Fígado	40	45.0
Wilson et al., 1996	Irlanda Norte	Pele	140	7.1
Rusul et al., 1996	Malasia	Carcaça Int.	445	35.5
Boonmar et al., 1998	Tailândia	Tecido	50	64.0
Relato promocional, 1998	EUA	Não descrito	≈1000	16.0
Uyttendaele et al., 1999	Bélgica	Pele	279	43.4
	França	Pele	434	32.9
	Itália	Pele	13	30.8
	Reino Unido	Pele	44	31.8
Alexandre et al., 2000	Chile	C e O	1.524	9.4
Cang, 2000	Coréia	Tecido	27	25.9
Dufrenne, 2001	Holanda	Carcaça Int.	89	13.5
White et al., 2001	EUA	Galinha caipira	51	35.0
	EUA	Peru caipira	50	24.0
Harrison et al., 2001	Reino Unido	Carcaça Int.	95	53.0
Zhao et al., 2001	EUA	Carcaça Int.	212	4.2
Murakami et al., 2001	Japão	Partes	90	37.8

C: carne; P: pele; O: órgãos internos; Cong.: congelado; Resf.: resfriado; Int.: inteiro.

Fonte: Simmons et al., 2003.

2.2.4 *Salmonella* Isoladas de Carcaças de Frangos e Resistência a Antimicrobianos

O uso terapêutico de antimicrobianos constitui um importante papel na prevenção de disseminação de doenças entre os animais, tratamento de animais doentes, promoção de crescimento e prevenção na transmissão de agentes de zoonoses. Desde o descobrimento da aplicabilidade dos antimicrobianos em animais de produção seu uso tornou-se comum (CDC, 2004).

O aumento da incidência de bactérias resistentes a antimicrobianos associadas com doença em humanos, a mudança do tipo e nível de resistência destes patógenos, direcionaram a atenção nos últimos anos aos animais de produção (LOGUE et al., 2003). A Organização Mundial da Saúde cita que a incidência de cepas de *Salmonella* resistentes a quinolonas, em animais e humanos, aumentou nos anos subseqüentes ao licenciamento das fluoroquinolonas, como a enrofloxacina, para o uso veterinário (WHO, 1998).

Na década de 90 o aumento significativo na incidência de *S. Enteritidis* em surtos alimentares, infecções em humanos, fontes não humanas, carcaças de frango e outros produtos avícolas foram descritos no Brasil (HOFER; REIS, 1997; PERESI et al., 1998; SANTOS et al., 2000), época em que a resistência antimicrobiana emergiu como maior tópico de discussão em saúde pública, tal fato, devido à dificuldade de tratamento de pacientes hospitalizados com certos tipos de infecções e ao aumento dos custos de internação devido a necessidade do uso de drogas mais caras (MORENO, 2000).

A contaminação por *Salmonella* em frangos é demonstrada no campo e matadouro, assim a contaminação cruzada de microrganismos contendo genes de resistência a antimicrobianos pode ocorrer entre os animais, devido a fatores estressantes no campo e também durante o processo de abate. Conseqüentemente, um pequeno número de carcaças contaminadas pode servir como fonte de disseminação de bactérias resistentes (LOGUE et al., 2003).

Poucos estudos foram realizados até o momento, para a determinação de perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* isoladas de carcaças de frangos, porém nas pesquisas realizadas envolvendo produtos avícolas, a presença de bactérias multi-resistentes a antimicrobianos é reportada por vários pesquisadores (BOKANY et al., 1990; HOFER;

REIS, 1997; LOGUE et al., 2003; MOREIRA; MORAES, 2002; POPPE et al., 1996; SANTOS et al; 2000; SILVA; DUARTE, 2002).

Em Minas Gerais, um estudo realizado com 20 carcaças de frangos obtidas nas plantas de abate revelou a presença de dez gêneros de bactérias Gram-negativas, dentre estas, a *Salmonella* apareceu com 54,3% de frequência e as cepas foram resistentes a aminoglicosídeos (87,18%), tetraciclinas (56,41%), nitrofuranos (52,56%), sulfas (39,74%), macrolídeos (37,18%), cloranfenicol (37,18%), quinolonas (21,80%) e beta-lactâmicos (14,10%). A resistência às quinolonas (ácido nalidixico, perfloxacina e norfloxacina) foi destacada, pois estas são usadas em produção animal e em tratamento de humanos (MOREIRA;MORAES, 2002).

Em Jaboticabal, São Paulo, cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frangos congeladas foram testadas frente à doze antimicrobianos, sendo que 100% dos isolados foram resistentes à ampicilina, 75% à cefalotina, 52,1% à cefoxitina, além de resistência à outros fármacos, em menores percentuais, incluindo gentamicina, metilmicina, aztreonam, tetraciclina, amicacina, tobramicina e polimixina B (SANTOS et al., 2000).

Oliveira et al. (2005) determinou o perfil de resistência a antimicrobianos em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras humanas, alimento, amostras avícolas e carcaças de frangos. Em 22 amostras de S. Enteritidis isoladas de carcaças 98% apresentaram resistência à, no mínimo, um antimicrobiano. As cepas apresentaram resistência a sulfametoxazole (90,9%), nitrofurantoína (86,4%), e tetraciclina e estreptomicina (9,1%).

Em estudo realizado na Etiópia, foram analisadas 378 carcaças de frangos para isolamento de *Salmonella* e determinação de resistência à antimicrobianos. Em 80 amostras positivas para *Salmonella*, 63,7% apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos. Porém, no mesmo estudo, 100% das amostras foram sensíveis as quinolonas, nitrofuranos e cefalosporinas (MOLLA et al., 2003).

A pesquisa de Wilson (2004), na Irlanda do Norte, verificou as resistências antimicrobianas de salmonelas isoladas de frangos em partes, frangos inteiros importados e amostras clinicas humana. As análises revelaram 27 isolados de *Salmonella* nos 150 frangos importados do Brasil, todos apresentando resistência a mais de um antimicrobiano.

2.2.5 Comportamento de *Salmonella* em Alimentos Frente ao Estresse Térmico

A presença de microrganismos em alimentos, como *Salmonella* e *Escherichia coli*, pode alterar o tempo de vida de prateleira e a sanidade dos mesmos. Conseqüentemente, as empresas produtoras de alimentos desenvolveram tratamentos durante o processo de produção para preservar os alimentos, através da destruição dos microrganismos presentes ou através de danos sub-letais (injúria) para prevenir o crescimento (EVERIS, 2001).

Tratamentos térmicos utilizados nas indústrias de alimentos e na cocção dos alimentos são, em geral, efetivos na destruição de células vegetativas e patógenos alimentares. Tais processos térmicos foram baseados em dados de experimentos desenvolvidos em laboratórios, contudo, ocasionalmente, pode haver salmonelas que sobrevivam a esses processos. A sobrevivência de *Salmonella* a certos processos térmicos é decorrente de fatores que incluem tipo e formulação dos alimentos, sólidos totais, acidez, atividade de água (DOYLE; MAZZOTTA, 2000) e sorovar de *Salmonella* (DOYLE; MAZZOTTA 2000; EVERIS, 2001; TAYLOR-ROBINSON et al., 2003; SHERRY et al., 2004).

Os microrganismos podem estar presentes em três estados no alimento: mortos (injúria letal e inabilidade de crescimento), injúria sub-letal (habilidade em reparar seu crescimento sob condições corretas) e vivos. As alterações podem acontecer no material genético (DNA e RNA), produzidas por tratamento com altas temperaturas, congelamentos e resfriamentos. Alterações de membrana, também podem ocorrer, por exemplo, quando as células são submetidas a baixas temperaturas, então ocorrendo alteração de permeabilidade da membrana e extravasamento do conteúdo celular, ou, quando são submetidas ao congelamento, onde as partículas de gelo podem também promover o rompimento da membrana (EVERIS,2001; BOZIARIS; ADAMS, 2001).

Bactérias têm capacidade de produzir, em função aos tratamentos térmicos, mecanismos de respostas, como proteínas especializadas para resistência térmica (*heat-proteins*) aumentando a resistência ao choque térmico; mudanças na estrutura da membrana (alteração na saturação de ácidos graxos para proteção contra baixas temperaturas) e reparação de material genético (EVERIS, 2001), assim confirmando a capacidade de reparo

de células injuriadas e podendo acontecer em curto espaço de tempo (BOZIARIS;ADAMS, 2001).

Diferentes sorovares de *Salmonella* possuem diferentes níveis de tolerância ao calor e frio aplicados. Vários autores apontam o sorovar Typhimurium como de menor resistência aos tratamentos térmicos e o sorovar Senftenberg, o mais resistente ao calor. Também é consenso entre os autores que a presença de flora acompanhante a *Salmonella* promove um incremento de resistência das salmonelas aos tratamentos (DOYLE; MAZZOTTA 2000; TAYLOR-ROBINSON et al., 2003; SHERRY et al., 2004). A presença de outras bactérias induz a redução no nível metabólico das células de *Salmonella* e estas se tornam menos susceptíveis aos efeitos deletérios (ROBINSON et al., 2003).

A resistência de *Salmonella* aos tratamentos térmicos é maior quando as mesmas estão em fase estacionária (lag) do crescimento, na presença de gordura e presença de células velhas de *Salmonella* (DOYLE; MAZZOTTA 2000; BOZIARIS; ADAMS, 2001; TAYLOR-ROBINSON et al., 2003).

Esforços para o controle de salmonelas em frangos incluem processos térmicos focados nos pontos de cocção adequada, em cozinhas domésticas e indústrias de alimentos, além da adoção de medidas higiênicas e medidas de descontaminação em frangos durante o processo de abate. Usualmente 74°C elimina as células de salmonelas no alimento, porém produtos congelados em grandes porções requerem um descongelamento prévio adequado, para a eliminação do patógeno 74°C (DOYLE; MAZZOTTA 2000, USDA, 2004).

2.2.6 Contaminação Cruzada por *Salmonella* nos Alimentos

Infecções por *Salmonella* em humanos podem resultar da ingestão de produtos de origem animal. Frangos são veículos comuns deste microrganismo devido a sua contaminação inicial e a manipulação das carcaças de maneira incorreta (cocção insuficiente e refrigeração inapropriada, por exemplo) que permitem a sobrevivência e propagação das células infecciosas (BRYAN;DOYLE,1995).

Gorman et al. (2002) elaboraram um projeto com objetivo avaliar a contaminação microbiana durante o preparo de frangos na casa de consumidores. O potencial para contaminação cruzada das bactérias (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* e

Staphylococcus aureus) foi avaliado com a eleição de seis diferentes pontos na cozinha (pano de louça, mãos dos manipuladores, refrigerador, forno, esponja e avental) para a avaliação da presença das bactérias. Foram preparados 25 frangos e em cinco amostras não foi detectada a presença das bactérias analisadas. Nas 20 amostras restantes foram isoladas *Salmonella* em duas delas, recuperadas a partir do pano de prato em uma das amostras e em outra, a partir do avental do cozinheiro. O estudo mostrou que um pequeno número de *Salmonella* infectando frangos apresentou 100% de contaminação cruzada em outros sítios na cozinha do consumidor, sendo que cada ponto com presença da bactéria, tornou-se alvo potencial para a contaminação cruzada nos outros pontos analisados.

Jørgensen et al. (2002) citam em estudo de prevalência e número de *Salmonella* e *Campylobacter*, que o risco de contaminação cruzada desencadeado a partir de carcaças de frangos, pode ser proporcional ao número de células presente nas mesmas.

O perigo da contaminação cruzada ainda existe após a cocção dos alimentos. A separação de utensílios usados na preparação de alimentos antes e depois do cozimento é essencial para a prevenção da contaminação cruzada. A contaminação pode ocorrer em cozinhas onde são preparados frangos crus e depois, a mesma faca usada no preparo é também usada (sem ter sido lavada) em outros alimentos já cozidos (DOYLE; CLIVER, 1990). As mãos dos preparadores de alimentos, utensílios sujos ou superfícies de trabalho que tiveram contato com frangos crus são fontes de contaminação em alimentos cozidos no pós-preparo (BRYAN; DOYLE, 1995).

Costalunga; Tondo (2002) estabeleceram fatores que contribuíram para os surtos de salmonelose no Rio Grande do Sul entre 1997 e 1999. A contaminação cruzada no preparo dos alimentos destacou-se em sexto lugar, com 5,53% de responsabilidades nos desencadeamento dos episódios.

2.2.6.1 Preparação, Estoque e Consumo

Os passos demonstrados na Figura 1, indicam as etapas de preparação de frangos nas cozinhas que influenciam na contaminação, sobrevivência ou crescimento de patógenos transmitidos pelos mesmos (BRYAN; DOYLE, 1995).

2.2.6.2 Descongelamento

Frangos inteiros e partes de frangos deveriam ser descongelados “overnight”, ou seja, de um dia para outro no refrigerador, afim de que a temperatura da superfície do frango mantenha-se baixa e previna o crescimento de bactérias. Contudo, os frangos são descongelados fora do refrigerador ou em fornos de microondas. Quando o descongelamento ocorre à temperatura ambiente, por longo tempo, a temperatura da superfície da carne aproxima-se à ambiente, facilitando o crescimento de bactérias. O descongelamento em fornos de microondas promove descongelamento desigual, e possíveis áreas congeladas não sofrerão cocção adequada. Durante o descongelamento é gerado um fluido, e este, contaminado, pode ser um perigo adicional à preparação de alimentos crus (KELLY, et al., 2000).

2.2.6.3 Manipulação de Produtos Crus

As mãos dos preparadores, assim como os utensílios (serras, facas, afiadores, recipientes de estoque e cortadores) podem tornar-se contaminados quando frangos crus são manipulados. As salmonelas disseminam-se para outros alimentos e materiais de cozinha, mãos e superfícies, a menos que estas sejam cuidadosamente lavadas entre as operações. Roupas, esponjas e panos de cozinha também podem tornar-se contaminados e multiplicarem o número de microrganismos com o tempo (BRYAN; DOYLE, 1995).

2.2.6.4 Cocção

Durante a cocção por métodos típicos (assado, frito ou grelhado), a superfície dos frangos usualmente alcança temperaturas de, por exemplo 74°C, nas quais as salmonelas são eliminadas. Contudo, formas vegetativas da bactéria, em porções dos frangos ainda congelados, porções espessas e cavidade visceral podem sobreviver se a temperatura de cocção for muito baixa e/ou o tempo for muito curto (BRYAN; DOYLE, 1995).

O FSIS (Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar, EUA) recomenda que a temperatura interna de cocção dos frangos seja 74°C e recomenda o uso de termômetro para aferir esta temperatura (USDA, 2004).

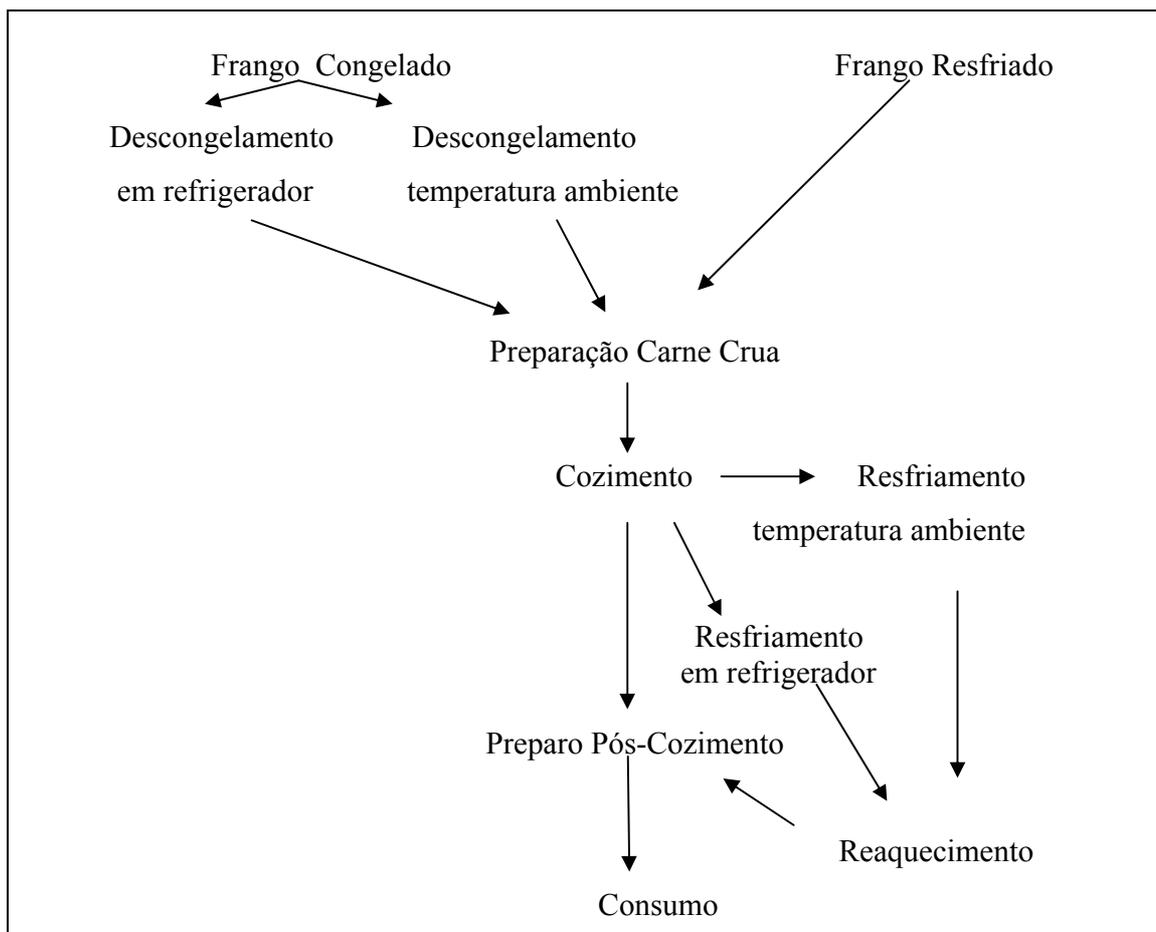


Figura 1 Passos do processo de preparação, desde o ponto de descongelamento até o consumo Fonte: Kelly et al., 2000.

2.2.6.5 Congelamento e Reaquecimento

Práticas comuns em restaurantes e domicílios, como manter os alimentos cozidos à temperatura ambiente e refrigeração de grandes volumes de alimentos nos refrigeradores, constitui um risco para a multiplicação e sobrevivência das salmonelas.

As sobras de comidas reaproveitadas, principalmente em restaurantes, podem sofrer contaminação cruzada e, não raramente, são re-aquecidas a temperaturas muito baixas, não suficientes para matar as salmonelas presentes (BRYAN; DOYLE, 1995).

2.3 *Salmonella* na Criação e em Carcaças de Frangos

O controle de *Salmonella* não é simples, pois inúmeras são as fontes de contaminação em um sistema de produção de frangos, incluindo granja de matrizes, incubatório, alimento, roedores, insetos, aves silvestres, transporte, meio ambiente da criação dos frangos, processo de abate e meio ambiente da planta de abate. Todas as fontes de *Salmonella* são potencialmente importantes contudo, o incubatório parece ter menos importância do que os fatores envolvidos no ambiente de crescimento para o produto final (BAILEY et al. 2001).

Corry et al., (2002) e Bailey et al. (2001) relatam que os sorovares de *Salmonella* diagnosticados no incubatório e em pintos de um dia foram encontrados em carcaças, porém em baixa frequência. Por outro lado, Byrd et al. (1999) encontraram em seus estudos correlação positiva entre os sorovares encontrados no incubatório e carcaças. No mesmo contexto, Limawongpranee et al. (1999) citam que os sorovares encontrados em incubatório também são encontrados em amostras de campo e podem ser recuperados em carcaças após o processo de abate.

O estresse causado durante o transporte ao abatedouro aumenta a contaminação de *Salmonella* das aves antes do abate. Pesquisas de *Salmonella* nas caixas de transporte de frangos demonstram que os sorovares identificados a campo e sorovares isolados das caixas de transporte são frequentemente encontrados nas análises de carcaças após o processamento no matadouro (SHACKELFORD, 1988; BAILEY, 1988; BAILEY et al., 2001; CORRY et al., 2002, ROY et al., 2002).

Em estudo realizado por Corry et al. (2002) foram analisadas caixas de transporte de aves quanto à presença de *Salmonella* em dois momentos, ao descarregamento dos frangos na plataforma de abate e após a lavagem e desinfecção das mesmas. As amostras de *Salmonella* isolados antes da limpeza das caixas refletiram, geralmente, as amostras presentes no campo. Sorovares isolados após a limpeza das caixas foram diferentes dos

encontrados a campo, e não reapareceram nas carcaças após o abate. Tais resultados sugeriram que os sorovares estavam nas caixas antes do transporte das aves ao abate, isso devido à ineficiente limpeza das mesmas.

2.4 Diagnóstico de *Salmonella* em Aves e Produtos Derivados

O Ministério da Agricultura instituiu através da Portaria número 212, de 06 de novembro de 1995 e Instrução Normativa, número 22, de 12 de agosto de 1999 as metodologias de bacteriologia e sorologia para diagnóstico de *Salmonella* (BRASIL, 1995).

2.4.1 Teste Microbiológico Convencional

A metodologia bacteriológica utilizada para o diagnóstico consta de isolamento, identificação bioquímica e caracterização antigênica. Para a identificação final da presença de salmonelas são necessárias as fases de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meio sólido, seleção de colônias suspeitas, identificação bioquímica e sorológica.

Para o enriquecimento usa-se água peptonada (AP)1% ou caldo BHI (infusão de cérebro coração) que são Incubados 37°C por 24 horas. Para o enriquecimento seletivo os caldos Rappaport-Vassiliadis (RV), selenito-cistina (SC) e tetrionato (TT), neste, o acréscimo de solução iodo-iodetada, e solução verde de malaquita são recomendados. As temperaturas e tempo de incubação variam conforme a amostra analisada, porém a temperatura de 42°C é a mais utilizada.

No isolamento em meio sólido, alguns ágaros dentre os vários disponibilizados pelos laboratórios que os desenvolvem, são indicados pelo Ministério da Agricultura, como os meios Ágar Mc Conkey, Ágar Verde Brillhante com novobiocina (BGN), Ágar Hektoen, Ágar Rambach e o Ágar XLT4 (Agar Xilose Lisina Tergitol 4). Além de seletivos os meios são diferenciais, pois as colônias de bactérias crescem com diferentes características. Os ágaros são incubados a 37°C por 24 horas.

O BGN caracteriza-se por ser um meio altamente seletivo, recomendado para o isolamento de *Salmonella*, exceto o sorovar Typhi, e outras bactérias. O crescimento de outras bactérias, que não sejam *Salmonella* é quase completamente inibido pela presença da tinta verde brilhante (DIFCO, 1984), já para o meio XLT4, Miller e Tate (1990) o descrevem como específico para o isolamento de *Salmonella* em cultura pura ou em meio à uma grande variedade de bactérias (YNTERIAN, 2003).

A estas etapas, segue os testes bioquímicos presuntivos, apresentando características de mudança de pH e alteração de coloração dos meios de cultura, quando houver crescimento bacteriano. Na presença de *Salmonella* o meio TSI (*Triple Sugar Iron*) apresenta bisel alcalino com produção de gás positiva ou negativa, o meio LIA (*Lysine Iron Agar*) mostra-se alcalino na base e com ou sem presença de gás H₂S. O meio SIM (*Sulphur Indol Motility*) determina se os microrganismos são móveis ou não, e é base para prova do indol. O caldo uréia apresenta reação de urease-negativa para a presença de *Salmonella*. A leitura dos testes é realizada após a incubação a 37°C por 24 horas.

Colônias que apresentarem a leitura dos testes bioquímicos preliminares compatíveis com *Salmonella* passam pela caracterização bioquímica definitiva com testes para utilização do citrato, transformação da fenilalanina, utilização do malonato, descarboxilação da lisina e ornitina, fermentação de carboidratos, desidrolação da arginina, prova do vermelho de metila e prova de Voges-Proskauer. Se confirmado o perfil esperado para *Salmonella*, prossegue-se a caracterização antigênica com soro anti-somático O polivalente de *Salmonella* sp. A identificação final de sorovar é realizada pelos laboratórios credenciados ou de referência (BRASIL, 2005).

2.4.1.1 Teste de Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A metodologia tradicional (microbiologia convencional) para detecção de *Salmonella* requer no mínimo quatro dias para obtenção de resultado negativo. As indústrias de alimentos necessitavam de resultados em menor tempo para reduzir a estocagem de produtos e custos associados, assim métodos rápidos para detecção de *Salmonella* foram propostos, dentre eles o ensaio imunoenzimático - ELISA (FLOWERS et al., 1988).

O primeiro ELISA para detecção de *Salmonella* foi relatado por Krysinski e Heimsch (1977), a partir deste muitos outros ensaios têm sido desenvolvidos usando anticorpos policlonais e monoclonais, que detectam grande parte dos sorovares de *Salmonella*, sendo que alguns destes ensaios são disponibilizados comercialmente em formas de kits prontos para o uso. Diferentes kits possuem diferentes especificidades e sensibilidades na detecção de *Salmonella*, isso devido à ocorrência de resultados falsos negativos (resultados que se apresentam positivos pela microbiologia convencional) e resultados falsos positivos (que se apresentam negativos pela microbiologia convencional) influenciados por fatores referentes aos componentes do kit, às amostras e microrganismos pesquisados (BEUMER, 1991; MANSFIELD; FORSYTHE, 2001).

Um sistema ELISA foi desenvolvido para detecção de *Salmonella* com leitura de resultados sem aparelhos de densidade óptica, o qual apresenta-se conveniente para o manuseio e interpretação visual em laboratórios. O ensaio Tecra[®] *Salmonella* VIA (SALVIA), um dos ensaios visuais, tem configuração *sandwich* utiliza anticorpos policlonais e os resultados presuntivos podem ser obtidos em 42-52 horas.

O teste SALVIA foi avaliado em diferentes estudos de comparações com outros métodos de detecção. Flowers et al. (1988) analisaram a eficiência de dois kits comerciais de leitura visual para detecção de *Salmonella* em vários tipos de amostras de alimentos. Para a detecção em carne crua, foram inoculados dois níveis de contagem de células de *Salmonella*, um nível descrito como baixo 0-5 células/25g de carne e um alto nível de contaminação 10-50 células/25g ou 0,11 NMP/g e 1,5 NMP/g, respectivamente. A utilização dos kits foi procedida de acordo com as instruções do fabricante. As taxas de detecção através da utilização dos dois kits foram de 44% para o baixo nível de inoculação e 93% para o alto nível de inoculação (FLOWERS et al., 1988).

Outro estudo para avaliação do kit SALVIA, conduzido por Paula et al. (2002) relatam 75,46% de concordância nos resultados dos kits comparados ao teste microbiológico convencional e observaram também, que para alimentos com grande flora acompanhante (carne, peixe e frango) um pós-enriquecimento das amostras é recomendado para aumento da eficiência do sistema.

Trabalhos foram realizados com a utilização prática do kit citado. Lambrini et al. (1990 apud DICKEL, 2004) encontrou 95% de concordância de resultados com o teste de

microbiológico convencional. Dickel (2004) na utilização do kit SALVIA em carcaças de frangos detectou 31,7% de positividade para *Salmonella* no teste de microbiologia convencional e 16,7% no teste de ELISA para carcaças coletadas antes do *chiller* e 20% e 10% de positividade para os respectivos testes, nas carcaças coletadas após o *chiller*.

2.4.2 Diagnóstico Bacteriológico por Suabe de Arrasto de Cama Aviária

Para o diagnóstico bacteriológico as amostras a serem testadas provenientes do ambiente das granjas podem ser coletadas através da técnica de suabe de arrasto (BRASIL, 1995).

O suabe de arrasto foi proposto em substituição ao cultivo de cama para o monitoramento de lotes comerciais. A avaliação do suabe de arrasto foi estabelecida por ser de simples manuseio, evitar contaminação cruzada durante o processamento e ter custo reduzido na coleta e processamento (KINGSTON, 1981), porém alguns parâmetros físico-químicos da cama aviária parecem interferir nos resultados. Os parâmetros que podem apresentar influência são atividade de água da cama, umidade, pH e concentração de amônia (CARR et al., 1995; HAYES et al., 2000).

Em uma avaliação de suabes de arrasto para detecção de *Salmonella* em galpões desocupados e ocupados, foi constatado que, existiu maior persistência de salmonelas em galpões com a presença do plantel, sugerindo que a presença das aves faz com que tais microrganismos mantenham-se viáveis. No mesmo estudo, os autores relatam que, possivelmente, quanto maior o número de suabes arrastados em cada galpão, maior a probabilidade de isolamento de *Salmonella* e identificação de diferentes sorovares (CALDWEL et al., 1994).

Durante agosto de 1995 a novembro de 1996, Riemann et al. (1998) conduziram uma avaliação de sorovares de *Salmonella* isolados por suabes de arrasto. Nos meses estudados, observaram que diferentes sorovares de *Salmonella* são encontrados no mesmo ambiente, em diferentes períodos de avaliações, indicando a sucessiva introdução de agentes por vetores ambientais. No mesmo contexto, experimento realizado por Caldwell et al. (1995) detectaram a partir de suabes de arrasto, vários sorovares de *Salmonella* durante onze meses de coleta de amostras, sugerindo existência múltiplas fontes potenciais de

contaminação durante a fase de crescimento dos frangos. Ainda no mesmo estudo, relatam que os sorovares encontrados não apresentaram tendência de repetição num mesmo galpão, porém os isolamentos de sorovares comuns apareceram repetidos numa pequena porcentagem das áreas geográficas estudadas.

A avaliação de métodos de isolamentos de *Salmonella* realizada por Kingston (1980), analisou resultados obtidos entre amostras coletadas com suabes de arrasto e com suabes de cloaca. A comparação mostrou maior eficiência na detecção de salmonelas através do método de suabe de arrasto, recuperando maior número de amostras positivas e apresentando menor custo de aplicação.

2.4.3 Utilização da Técnica de Numero Mais Provável (NMP)

Historicamente, a enumeração de microrganismos tem sido feita por microbiologistas de alimentos através de dois processos principais: procedimentos quantitativos, como contagem direta em placas com o auxílio de microscópio eletrônico ou, semi-quantitativos com metodologias *standard*, como a contagem direta em placas (APC), onde a enumeração das unidades formadoras de colônias (ufc) é realizada a partir do ágar de cultura; ou metodologia para contagem por múltiplos tubos, estimando o NMP.

Contagem direta de microrganismos tem sido considerada mais acurada, porém o tempo gasto para realização é longo e é virtualmente impossível a detecção da viabilidade dos microrganismos. Procedimentos semi-quantitativos geralmente usam enumeração de microrganismos viáveis, porém a margem de erro associada à estimativa numérica é ampla. Esta margem de erro está relacionada à fatores humanos no processamento das amostras (pesagem, diluições, homogeneização, plaqueamento e contagem) e à flora determinante da análise (microrganismos injuriados ou latentes, substratos para crescimento, características das colônias e quantidade de microrganismos sobre o ágar) (WHITTEMORE, 1993).

A técnica de NMP é um método indireto de estimar a população bacteriana, baseada em probabilidades estatísticas. A técnica pode ser combinada com vários processos de identificação de *Salmonella*, assim amostras de 25 gramas de alimento, suabes ou água de enxágüe podem ser processos associados (IZAT et al., 1991a).

O enxágüe de carcaças inteiras de frangos é usado para determinar o NMP, sendo que diferentes meios de cultura e volumes de meio de cultura para o enxágüe são escolhidos nas pesquisas. Cox et al. (1983) avaliaram diferentes volumes (100 mL e 300 mL) de meios de cultura no enxágüe de carcaças e a recuperação de *Salmonella* inoculada. O volume de meio remanescente após o enxágüe das carcaças com 100 mL foi 70% do volume inicial e com 300 mL foi 85% do volume inicial. Durante os procedimentos, observaram que o volume de 100 mL foi adequado para o enxágüe de carcaças com até 1.200 gramas e o mesmo volume apresentou-se adequado para recuperação de *Salmonella*. Os autores concluíram que o menor volume usado no enxágüe das carcaças apresentou vantagens como a economia de meio de cultura e maior concentração de células na solução após o enxágüe.

Uyttendaele et al. (1998) analisaram a presença de *Salmonella* em carcaças de aves congeladas e outros produtos derivados, por determinação semi-quantitativa. Foram analisadas amostras de 100 cm², 25 cm² e 1 cm² de pele de frango e amostras de 25 gramas de pele e carne. Em 27,3% das carcaças de frango analisadas a contaminação foi de 1 ufc/100 cm² ou 25 cm² e 25 gramas, classificadas como baixa contaminação e no último dos quatro anos em que a pesquisa foi realizada, 30,2% das carcaças apresentaram mais de 1 ufc/cm² ou grama. Ao final do estudo, somente 5% das amostras analisadas apresentaram alta contaminação, ou seja, mais de 1 ufc/cm² ou 25 gramas. Os autores também citam, não ser possível a obtenção de carcaças de aves com total ausência de *Salmonella* sem algum processo de descontaminação.

Dufrenne et al. (2001) desenvolveram uma metodologia para determinação de NMP de *Campylobacter* e *Salmonella* em carcaças de frangos. A pesquisa consistiu na determinação da presença e número dos microrganismos em carcaças de frangos congeladas e refrigeradas. As carcaças foram divididas em duas metades iguais e o enxágüe inicial de cada metade, foi realizado com 250 mL de água peptonada, sendo que uma das metades, com o volume 250 mL foi usada na pesquisa de *Salmonella* e outra na pesquisa de *Campylobacter*. Para a pesquisa de *Salmonella*, a solução de enxágüe foi dividida em 9 tubos de ensaio (3 x 50mL, 3 x 5mL e 3 x 0,5mL), sendo que aos últimos três tubos foram adicionados 5mL de água peptonada autoclavada, e incubados por 18 ±2 horas à 37°C. Após esta etapa, 0,1mL de cada tubo da solução de enxágüe foi transferido para outros 9

tubos contendo Rappaport-Vassiliades (RV), sendo incubados durante 24 ± 2 e 48 ± 2 horas à 42°C . Após incubados, as culturas de RV foram estriadas em ágar verde brilhante e encubadas 24 horas à 37°C . A leitura de placas positivas em cada série de três tubos compôs o número para averiguação na tabela de NMP de DeMan (1983). Usando esta metodologia, foram detectadas 89% das amostras contaminadas por *Salmonella* contendo 0-10 células/carcaça, 9% apresentando 11-100 células/carcaça e 2% apresentando >1.100 células/carcaça como números mais prováveis.

A determinação do NMP no presente trabalho teve como base a metodologia descrita por Duffrenne et al.(2001), adaptada no volume de meio de cultura para enxágüe das carcaças, baseado no trabalho de Cox et al. (1983).

2.5 Suscetibilidade Antimicrobiana

A monitora veterinária de suscetibilidade de bactérias a antimicrobianos é obrigatória em vários países e as recomendações de monitoria são reportadas nas reuniões da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Oficina Internacional de Epizootias (OIE).

A análise de suscetibilidade de bactérias a antimicrobianos, desenvolvida nas pesquisas obtém dados por metodologias de microdiluição ou difusão, que são metodologias quantitativas e podem ser expressas em MIC (concentração inibitória mínima) e DZI (diâmetro de zona de inibição). Os resultados de suscetibilidade são usualmente descritos em três categorias: resistente, sensível ou intermediário (MORENO et al., 2000).

Os padrões de susceptibilidade são determinados pelo NCCLS (National Committee for Clinical Standards) e usados para a interpretação dos resultados de MIC e diâmetro da zona de inibição. A metodologia de difusão descrita por Bauer et al. (1966) é reconhecida em trabalhos nos diferentes países e os antimicrobianos eleitos para os testes em veterinária abrangem drogas de uso veterinário e humano (MOREIRA;MORAES, 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem Utilizada e Local de Realização das Análises

Os tamanhos das amostras de carcaças e suabes de arrasto foram definidos em função da disponibilidade de material. As análises foram realizadas no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) - Regional Serra, em Garibaldi RS.

3.1.1 Obtenção das Carcaças de Frangos

Carcaças de frango resfriadas foram obtidas, a partir de três marcas comerciais diferentes. As marcas foram definidas em função da disponibilidade semanal de carcaças de frangos resfriadas nos varejos da região Nordeste do Rio Grande do Sul. A partir da marca “A” foram adquiridas 55 carcaças, marca “B” 50 carcaças e marca “C” 75 carcaças, totalizando 180 amostras.

Foram adquiridas 10 carcaças semanalmente, todas compradas em um mesmo dia da semana e transportadas até o laboratório em caixas isotérmicas. O início do processamento ocorria em 20 minutos após a coleta.

Os matadouros das marcas de carcaças “B” e “C” estavam sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) e o abate diário em tais matadouros eram de 70.000 aves. O matadouro da marca “A” estava sob Serviço de Inspeção Estadual (CISPOA) e com abate diário de 5000 aves.

3.1.2 Obtenção dos Suabes de Arrasto

Os suabes de arrasto foram coletados por veterinários das empresas que os forneceram e os lotes de frangos nos galpões de coleta estavam entre 30 e 35 dias de idade. Na empresa C (empresa das carcaças da marca C) foram coletados 71 suabes de arrasto, em duas regiões geográficas distintas, denominadas “região 2”, com 37 amostras e “região 3” com 34 amostras coletadas. Outra empresa “D” forneceu 30 amostras de suabes de arrasto de uma região denominada “região 1”.

A divisão das regiões foi definida devido às diferenças de empresas avícolas que compunha o quadro ambiental, isto é, diferentes empresas com diferentes manejos de frangos a campo (pintinhos, alimentação, vacinações, visitas técnicas, meios de transportes e vetores ambientais) em um espaço físico limitado.

3.2 Metodologias Utilizadas

3.2.1 Metodologia Utilizada no Suabe de Arrasto

Os suabes foram confeccionados com 10 cm² de gaze cirúrgica e 110 cm de fio de algodão. Após confecção foram colocados, individualmente, em potes de vidro com 150 mL de água peptonada (AP) 1% e autoclavados por 15 minutos à 121°C, e então, refrigerados à 4°C. Para o transporte dos suabes foram usadas caixas de isopor contendo gelo.

No campo, os suabes foram arrastados por toda extensão da cama aviária em forma de “zigue-zague”, duas vezes consecutivas. Cada vidro de suabe correspondeu a amostra de um galpão de aves, ou seja, um lote de aves.

No laboratório os suabes foram incubados por 18±2 horas a 36±1°C. O enriquecimento seletivo ocorreu com transferência de 1mL da AP para o caldo tetrationato (TT) e 0,1mL da AP para o caldo Rappaport Vassiliadis (RV), sendo incubados por 24 a 30 horas nas temperaturas de 36±1°C e 41±0,5°C respectivamente. Após, os caldos foram semeados por esgotamento nos ágar verde brilhante com novobiocina (BGN) e xilose lisina tergitol 4 (XLT4) e incubados 24 horas a 36±1°C.

Placas com colônias enegrecidas no meio XLT4 e róseas no meio BGN foram consideradas positivas para presença de *Salmonella*. Uma colônia compatível com *Salmonella* de cada amostra foi selecionada e inoculadas nos meios de cultura para o teste bioquímico preliminar (TSI, LIA, SIM e uréia), além do meio de cultura ágar nutriente, para manutenção das colônias. Nas amostras, colônias com perfil compatível com *Salmonella* no teste bioquímico preliminar foram submetidas a sorologia com anti-soro polivalente O para *Salmonella* (Difco®). As colônias positivas na sorologia foram semeadas

em ágar estoque e enviadas a Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro, para identificação final.

3.2.2 Metodologia Utilizada para Determinação do NMP

Para o procedimento de enxágüe, as carcaças foram retiradas da embalagem plástica primária e foram transferidas para sacos plásticos (polietileno, capacidade 8 litros, marca Embale Bem) aos quais o volume de 150 mL de AP foi adicionado. Cada carcaça com 150 ml de AP passaram por 2 minutos de lavagem e massagem.

O volume de 150 mL de solução de enxágüe, após os 2 minutos de manipulação, foi dividido em uma série de 9 tubos de ensaio com a utilização de pipetas graduadas (1 mL, 10 mL e 20mL). Em 3 tubos de ensaio foi transferido 30mL da solução de enxágüe inicial, em outros 3 tubos, 3mL da solução e nos últimos 3 tubo da série, 0,3 mL da solução inicial. Aos últimos 3 tubos da série estes foram adicionados mais 3mL de AP autoclavada. Adicionalmente, um tubo com 3ml de solução inicial de enxágüe, foi preparado para a realização do teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) descrito no item 3.2.3. Os tubos com a solução de enxágüe da carcaça foram incubados à 37°C por 18±2 horas.

Subseqüentemente, 0,1 mL das culturas de AP foi transferida para tubos com 10 mL de RV e incubadas por 24±2 horas a 42°C. Todas as culturas dos 9 tubos de RV das séries foram semeadas por esgotamento em placas de ágar BGN e XLT4. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C.

As placas que apresentaram crescimento de colônias compatível com *Salmonella* foram consideradas positivas. Tomou-se nota das placas positivas lendo-se 3 placas de XLT4 e BGN por vez. Primeiro procedeu-se a leitura das placas correspondentes as culturas iniciais de AP da série de 3 tubos com os maiores volumes (30mL), após os a série de 3 tubos correspondentes ao volume de 3ml e finalmente, a série correspondente ao volume inicial de 0,3mL, assim a descrição dos resultados toma a forma de 3 números separados por hífen, por exemplo, 3 - 2 -1 que se refere o total de placas positivas.

A descrição dos resultados de positividade transportada a tabela de DeMan assim estimando-se o NMP por mL. Para o cálculo do NMP por carcaça o utilizou-se a fórmula matemática descrita por Dufrenne et al. (2001) (ANEXO A).

As colônias que apresentaram perfil compatível com *Salmonella* no crescimento em placa foram submetidas à sorologia com anti-soro polivalente O para *Salmonella* (Difco®) e estriadas em ágar estoque (extrato de carne 3 g, peptona 10g, cloreto de sódio 3g fosfato de sódio dibásico 2g, ágar 15g e água 1L). A identificação final foi realizada no laboratório de bacteriologia da FIOCRUZ.

3.2.3 Metodologia Utilizada na Técnica de ELISA

A partir do tubo com 3mL de solução de AP do enxágüe, descrito no item 3.2.2, foi realizado o ensaio imunoenzimático com um kit comercial de ELISA, Tecra® *Salmonella* VIA (SALVIA), conforme manual de instruções do fabricante. O sistema SALVIA compõe-se de pocinhos removíveis (*wells*), impregnados com anticorpos, oito reagentes (concentrado para lavagem dos pocinhos, controle positivo, controle negativo, diluente para os controles, conjugado, diluente para o conjugado, substrato, diluente para o substrato e solução *stop*) e cartão de cores para a interpretação dos resultados.

A partir dos tubos com 3 mL de solução foi transferido 0,1 mL, para 10 mL de caldo RV e encubado 18 ± 2 horas a 42°C. Um pós-enriquecimento da cultura de 0,1 mL da cultura de RV foi efetuado em 10 mL de caldo M-Broth caldo manose, (Merk®), que foi encubado por 6 horas a 37°C.

A partir do M-Broth foi retirado 1mL e inativadas as culturas (15 minutos de aquecimento a 100°C em banho-maria). Da cultura inativada foi retirado 200µL e colocado no pocinho do kit, então incubado por 30 minutos à 37°C. Após, retirou-se o M-Broth e procedeu-se a lavagem do pocinho por 3 vezes consecutivas com a solução de lavagem, então, foram adicionados 200µL do conjugado, e incubado novamente por 30 minutos a 37°C. Outras quatro lavagens dos pocinhos foram realizadas após a remoção do conjugado. Como último passo, adicionou-se 200µL de substrato, deixando-o o sistema a temperatura ambiente (20-25°C) por 15 minutos. A leitura do pocinho teste e dos controles foi efetuada através da comparação com o cartão de cores.

O ELISA foi realizado em 150 amostras de carcaças e todas as 180 amostras foram submetidas a pesquisa de NMP descrita no item 3.2.2.

3.2.4 Metodologia Utilizada para Determinação do Perfil Antimicrobiano

Quatro a cinco colônias de *Salmonella* foram retiradas de cada placa e transferidas para tubos com caldo BHI (caldo cérebro-coração) e incubados por 2 horas a 37°C.

Em 2,5 mL de PBS (tampão fosfato) foram transferidos 50 µL da suspensão com *Salmonella* e homogeneizado.

Todos os tubos com a suspensão tiveram 100 µL das mesmas semeadas em placas com ágar Muller-Hinton. A semeadura foi realizada com suabe estéril de algodão.

Ao fim do plaqueamento em Muller-Hinton, uma placa de XLT4 para cada amostra foi adicionalmente semeada, com o mesmo suabe, para controle de crescimento das colônias.

Após as placas semeadas foram deixadas em repouso por 15 minutos, e então aplicados os discos impregnados com antimicrobianos. Cinco discos de diferentes drogas foram aplicados por placa. As placas contendo os discos de antimicrobianos foram incubadas a 37°C por 18 horas, e então realizada a tomada de mediadas dos halos de inibição de crescimento das bactérias nas placas.

Os discos de antimicrobianos e concentrações utilizados foram eritromicina (ERI) 15µg, lincomicina (LIN) 2µg, penicilina (PEN) 10 UI, amoxicilina (AMO) 30µg, clortetraciclina (CLO) 30µg, doxiciclina (DOX) 30µg, estreptomicina + penicilina (EST+PEN) 10 + 10 UI, estreptomicina (EST) 300µg, josamicina (JOS) 150µg, polimixina B (POL B) 300 UI, enrofloxacina (ENR) 5µg, sulfametoxazol + trimetoprim 25µg, gentamicina 10µg, norfloxacina 10µg, ciprofloxacina 5µg, sulfadiazina + trimetoprima 25µg, neomicina 30µg, fosfomicina 50µg, florfenicol 30µg, espiramicina 30µg, lincomicina + spectinomomicina 9 + 100µg, ceftiofur 30µg, colistina 10µg, colistina + gentamicina 10 + 10µg, lincomicina + gentamicina 2 + 10µg, doxiciclina + sulfadiazina + trimetoprima 25µg e josamicina + trimetoprim 150 + 10µg. Os discos foram adquiridos das distribuidoras DME Brasil e Interchange Brasil. Foram submetidas ao teste 13 amostras de *Salmonella* isoladas das carcaças de frangos.

3.3 Análise dos Dados

Os resultados foram analisados pelos métodos Chi-quadrado, Exato de Fisher e Teste t de Student através do programa SPSS for Windows, versão 10.05, 1999.

4 RESULTADOS

4.1 Ocorrência de *Salmonella* nos Suabes de Arrasto

As empresas C e D apresentaram 15,8% de amostras de suabes positivas para *Salmonella*. Em 71 amostras da empresa C a positividade foi de 21,1% e em 30 amostras da empresa D o percentual de positividade foi de 3,3%. A avaliação estatística mostrou diferenças significantes ($p = 0,025$) no percentual de amostras com *Salmonella* entre as empresas analisadas (Tabela 4).

Tabela 4 Resultados de ocorrência de *Salmonella* em suabes de arrasto nas empresas C e D.

	Empresa		Total (%)
	C (%)	D (%)	
Resultado			
Positivo	15 (21,1)*	1 (3,3)*	16 (15,8)
Negativo	56 (78,9)	29 (96,7)	85 (84,2)
Total	71 (100)	30 (100)	101 (100)

* Há diferença significativa no percentual de amostras com *Salmonella* entre as empresas analisadas ($p = 0,025$).

Analisando a distribuição de suabes em regiões geográficas, a região 1 apresentou 3,3% de positividade para *Salmonella*, a região 2 apresentou 16,2% de positividade e na região 3 a positividade foi de 26,59% (Tabela 5).

Tabela 5 Resultados de ocorrência de *Salmonella* nas regiões geográficas 1, 2 e 3.

	Região			Total (%)
	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Resultado				
Positivo	1 (3,3)*	6 (16,2)*	9 (26,5)*	16 (15,8)
Negativo	29 (96,7)	31 (83,8)	25 (73,5)	85 (84,2)
Total	30 (100)	37 (100)	34 (100)	101 (100)

* Há diferenças significantes no percentual de *Salmonella* de acordo com as regiões (p = 0,041).

4.2 Pesquisa de *Salmonella* nas Carcaças de Frangos

A ocorrência de *Salmonella* nas amostras de carcaças de frango resfriadas foi de 12,2%. Diferentes percentuais de positividade foram encontrados nas três diferentes marcas A, B e C (Tabela 6).

Tabela 6 Ocorrência de *Salmonella* em carcaças de frango resfriadas nas marcas A, B e C.

	Marca			Total
	A (%)	B (%)	C (%)	
Resultado				
Positivo	3 (5,5)*	1 (2,0)*	18 (24)*	22 (12,2)
Negativo	52 (94,5)	49 (98)	57 (76)	158 (87,8)
Total	55 (100)	50 (100)	75 (100)	180 (100)

* Há diferenças significantes no percentual de amostras com *Salmonella* entre as marcas analisadas (p < 0,001).

Foram testadas as diferenças entre os percentuais de ocorrência de *Salmonella* nas seguintes formas: A contra B, A contra C e B contra C, a partir dos percentuais citados na Tabela 6. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os percentuais nas marcas A e B. Porém quando confrontadas as marcas A e C houve

diferença estatística significativa entre elas ($p = 0,005$) e no confronto dos percentuais de B e C também houve diferença estatística significativa ($p = 0,001$).

4.3 NMP de *Salmonella* nas Carcaças de Frangos

O NMP/mL foi determinado nos meios de cultura XLT4 e BGN para as amostras das três marcas comerciais. A média de contagem de células no meio XLT4 foi de 2,674 NMP/mL e no meio BGN foi de 1,2824 NMP/mL (Figura 2). Considerando as três marcas em conjunto, houve diferença significativa entre as médias para XLT4 e BGN ($p = 0,027$).

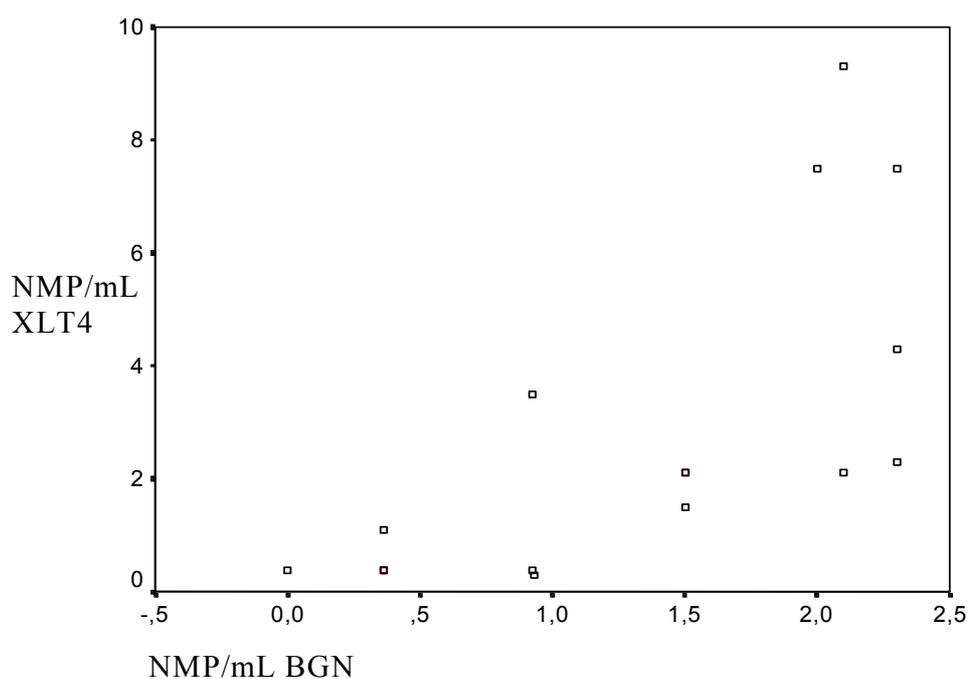


Figura 2 Contagem de células de *Salmonella* (NMP/ml) nos meios de cultura XLT4 e BGN.

Foram calculadas as correlações entre as médias de contagem em XLT4 e BGN para as três marcas comerciais independentemente (Figura 3). Somente na marca C a correlação entre as médias de contagem no XLT4 e BGN apresentaram significância estatística ($p = 0,011$) com correlação de 0,678 (correlação média).

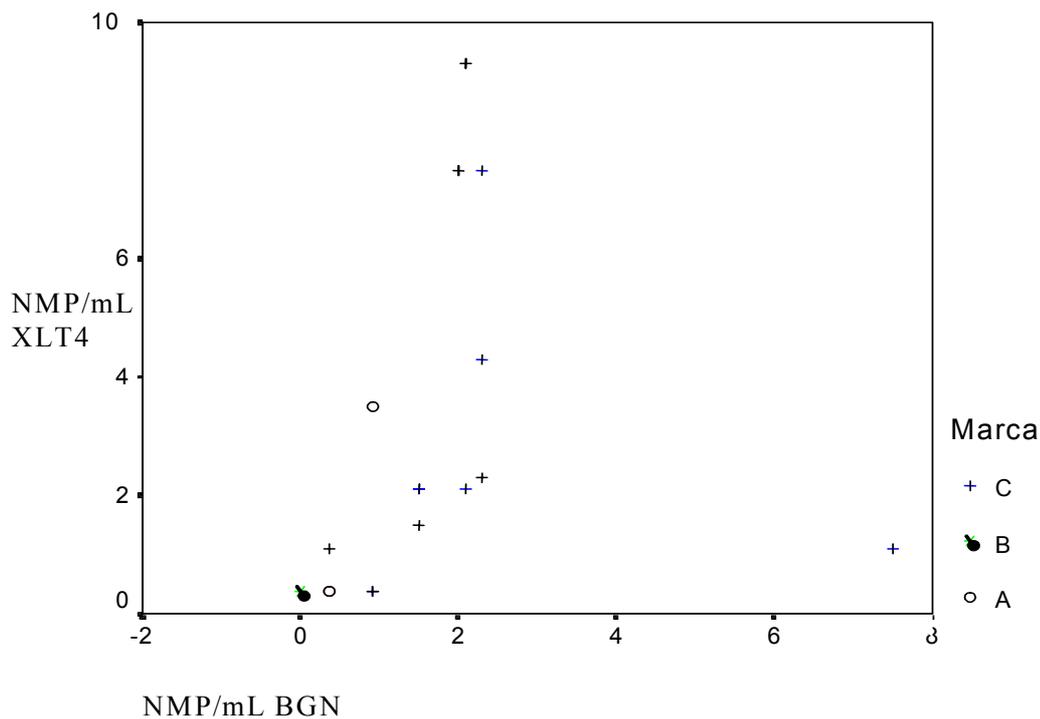


Figura 3 Contagem de células de *Salmonella* (NMP/mL) das marcas A, B e C, nos meios de cultura XLT4 e BGN.

A metodologia utilizada para o cálculo do NMP por carcaça está apresentada no ANEXO A . Os resultados para os meios XLT4 e BGN diferem para a quantidade de células em cada carcaça (Tabela 7).

Tabela 7 NMP de *Salmonella* por carcaça e percentual de ocorrência nos meios de cultura XLT4 e BGN.

NMP/ carcaça	XLT4 (%)	BGN (%)
0 – 10	0	0
11 – 100	45,45	64,70
101 – 1100	54,55	35,30
>1100	13,63	0

4.4 Resultados da Avaliação dos Kits para ELISA - SALVIA

Para a análise de presença de *Salmonella* em 150 carcaças de frangos resfriadas, foram utilizados dois kits SALVIA. O teste detectou 11,3% (17/150) de amostras positivas para *Salmonella*, enquanto a análise microbiológica convencional detectou 12,7% (19/150) de amostras positivas.

Os kits SALVIA analisados individualmente apresentaram diferentes percentuais de resultados falsos positivos e falsos negativos, sendo o total de resultados falsos negativo 9,3% e falsos positivos 8,0% quando comparados ao teste microbiológico convencional (Tabela 8).

Tabela 8 Resultados falsos positivos e falsos negativos nos kits SALVIA 1 e 2 utilizados na pesquisa de *Salmonella* em 150 carcaças de frangos.

Resultado do Teste	N° do Kit		Total (%)
	1 (%)*	2 (%)*	
Falso Positivo	9 (11,3)*	3 (4,3)*	12 (8,0)
Falso Negativo	8 (10,0)*	6 (8,6)*	14 (9,3)
Corretos	63 (78,8)*	61 (87,1)*	124 (82,7)
Total	80 (100)	70 (100)	150 (100)

* Não há associação estatisticamente significativa entre os kits 1 e 2 utilizados ($p = 0,264$).

Os resultados dos kits não apresentaram associação estatística significativa, isto é, os resultados obtidos independem do kit utilizado.

4.5 Sorovares de *Salmonella* Identificados

Diferentes sorovares de *Salmonella* foram identificados nas três marcas de carcaças e nos suabes de arrasto. Os sorovares e frequência de isolamento estão nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9 Sorovares de *Salmonella* e frequência de isolamento em carcaças de frango nas marcas comerciais A, B e C.

	Marcas comerciais e frequência de isolamento			Total (%)
	A	B	C	
Sorovar				
Enteritidis	0	0	7	7 (31,81)
Agona	0	0	7	7 (31,81)
Rissen	0	1	4	5 (22,73)
Heidelberg	2	0	0	2 (9,10)
Livingstone	1	0	0	1 (4,54)
Total	3	1	18	22 (100,0)

Tabela 10 Sorovares de *Salmonella* e frequência de isolamento por suabe de arrasto nas regiões 1, 2 e 3.

	Regiões e frequência de isolamento			Total (%)
	1	2	3	
Sorovar				
Enteritidis	1	2	2	5 (31,25)
Agona	0	2	2	4 (25,00)
Tennessee	0	1	1	2 (12,50)
Ohio	0	0	2	2 (12,50)
Rissen	0	0	1	1 (6,25)
enterica O: 3, 10	0	0	1	1 (6,25)
enterica O: 6, 71	0	1	0	1 (6,25)
Total	1	6	9	16 (100,0)

* As regiões 2 e 3 pertencem a empresa C e a região 1 pertence a empresa D.

4.6 Perfil de Resistência a Antimicrobianos das Salmonelas Isoladas de Carcaças de Frangos

As 13 amostras de salmonelas isoladas das carcaças de frango apresentaram resistência à pelo menos um antimicrobiano (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 Antimicrobianos e resistência de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango.

Antimicrobiano Testado	Amostras Resistentes/ Total (%)	Antimicrobiano Testado	Amostras Resistentes/ Total (%)
Penicillina (PEN)	13/13 (100)	Clortetraciclina (CLO)	3/13 (23,07)
Lincomicina (LIN)	13/13 (100)	Estreptomicina (EST)	2/13 (15,83)
Eritromicina (ERI)	13/13 (100)	Estreptomicina + penicilina (EST+PEN)	2/13 (15,83)
Enrofloxacina (ENR)	9/13 (69,23)	Doxiciclina (DOX)	1/13 (7,69)
Josamicina (JOS)	9/13 (69,23)	PolimixinaB (POL B)	1/13 (7,69)
Amoxicilina (AMO)	4/13 (30,76)		

Tabela 12 Perfil de resistência antimicrobiana e sorovares de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas.

Sorovares de <i>Salmonella</i>	Nº	Antimicrobianos resistentes
S. Livingstone	01	ERI, PEN, LIN, JOS, POL B
S. Enteritidis	04	ERI, PEN, LIN, JOS, ENR
S. Agona	01	ERI, PEN, LIN, JOS
S. Agona	01	ERI, PEN, LIN, ENR
S. Agona	02	ERI, PEN, LIN, AMO
S. Agona	02	ERI, PEN, LIN, JOS, AMO, CLT, ENR
S. Agona	01	ERI, PEN, LIN, EST, EST+PEN, ENR
S. Agona	01	ERI, PEN, LIN, JOS, CLT, EST, EST+PEN, DOX, ENR

Todas as amostras testadas apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos neomicina, gentamicina, espiramicina, colistina, norfloxacina, ciprofloxacina, florfenicol, ceftiofur, fosfomicina, espectinomicina e também às associações lincomicina + espectinomicina, colistina + gentamicina, lincomicina + gentamicina, doxiciclina + sulfadiazina + trimetoprim, josamicina + trimetoprim e sulfametoxazol + trimetoprim.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo diagnosticou positividade de 15,8% para *Salmonella* nos suabes de arrasto (Tabela 4) realizados nas empresas C e D. Os percentuais de positividade diferiram significativamente entre as empresas (empresa C, 21,1% e empresa D, 3,3%). As diferenças entre as positivities podem ser devido aos sistemas de biossegurança adotados e a aplicação efetiva dos mesmos em cada empresa, o que está de acordo com Bailey et al. (2001), que inferem serem inúmeras as fontes de contaminação em um sistema de produção de frangos, incluindo granja de matrizes, incubatório, alimento, roedores, insetos e aves silvestres, transporte, meio ambiente da criação, processo de abate e meio ambiente da planta de abate. Todas as fontes de *Salmonella* são potencialmente importantes, assim vários são os pontos a serem observados para o controle. Outra possível explicação do fato, recai sobre a utilização de agentes antimicrobianos durante o crescimento dos animais alterando a flora intestinal com conseqüente modificação de patógenos excretados e interferindo também, na resistência dos microrganismos às drogas utilizadas (BOKANY et al., 1990).

A partir do isolamento por suabes, quando a ocorrência é analisada entre diferentes regiões geográficas são notadas diferenças significativas nos percentuais (Tabela 5). Os sorovares identificados em cada região (Tabela 10) também apresentaram diferenças e o sorovar Enteritidis esteve presente nas três regiões, o que confirma a grande freqüência de aparecimento deste sorovar em amostras avícolas (SILVA;DUARTE, 2002; SANTOS, 2003; CDC, 2004). Caldwell et al. (1995) citam que os sorovares mais comuns podem se repetir numa mesma área, e diferentes áreas apresentam distintos sorovares, pois muitas são as fontes ambientais de introdução de *Salmonella* num sistema de criação, concordando com a distribuição e freqüências de sorovares no presente estudo.

Os percentuais de *Salmonella* em carcaças de frango citados na literatura estão entre 2,9 % e 68,6% (Tabela 3). O percentual de *Salmonella* em carcaças de frango resfriadas, encontrado nesta pesquisa foi de 12,2% a partir de três diferentes marcas comerciais analisadas. Este resultado está de acordo com os percentuais encontrados por Dufrenne et al. (2001), de 13,5% de positividade e Nascimento et al. (1997) que relatam 15,1% de positividade para *Salmonella*. Contudo, a ocorrência de 12,2% encontrada, difere daquelas

citadas por Santos et al. (2003), que encontraram 32% de contaminação, Dickel (2004), 20% e Cardoso et al. (2000) que não detectaram *Salmonella* nas amostras analisadas.

As diferenças de percentuais de *Salmonella* podem ocorrer, devido aos fatores de contaminação a campo, amostragem e metodologia laboratorial de detecção utilizada (UYTTENDAELE et al., 1998) e ao sistema de abate das aves nos diferentes países. Quanto às diferenças em sistemas de abate, pode-se citar os Estados Unidos (EUA), onde é permitida pelo USDA (Departamento de Agricultura), a utilização de quantidades de cloro na água do *chiller*, acima de 50 ppm e o Brasil, onde os níveis de cloro permitidos pela legislação são de 3 a 5 ppm (Dickel 2004). Estudos demonstraram que níveis de 18 a 100 ppm de cloro têm diferentes eficiências na redução das bactérias (YANG et al., 2001).

Na análise dos percentuais de *Salmonella* entre as marcas A (5,5%), B (5%) e C (18%) a diferença foi significativa (Tabela 6). Pesquisas efetuadas por Cardoso et al (2002), Santos et al. (2003), Dickel (2004) e Izat et al. (1991b) também relatam diferentes percentuais entre marcas comerciais distintas. As marcas B e C foram obtidas de matadouro com Inspeção Federal (IF) e a marca A, de matadouro com Inspeção Estadual (IE). Os resultados confrontados entre as marcas A (IE) e B (IF) não apresentaram diferenças significativas na contaminação por *Salmonella*, apesar de diferentes volumes de abate diário, ou seja, 5.000 aves na empresa A contra 70.000 aves na empresa B. O confronto entre as marcas A (IE) e C (IF) apresentaram diferença significativa, sendo a marca C com maior ocorrência do agente. Quando observada a ocorrência de salmonelas em carcaças nas empresas B e C, ambas com mesmo volume de abate diário de aves e pertencentes à IF, também foi revelada diferença estatística significativa entre os percentuais. A existência de diferença de percentuais entre as marcas pode ser explicada com um retrospecto do que foi explanado até o momento, ou seja, diferentes regras de produção e abate em cada empresa. Isso inclui pontos relevantes tais como a biossegurança a campo, os níveis de cloro na água do *chiller*, regras para controle de qualidade no processo de abate (BRASIL, 1998) e uso de antimicrobianos na produção dos frangos.

Os sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos, Enteritidis, Agona, Rissen, Heidelberg e Livingstone apresentaram diferenças de frequência entre as marcas (Tabela 9). Analisando a ocorrência de *Salmonella* em suabes de arrasto e em carcaças, observa-se que na empresa C (empresa das carcaças de marca C) os sorovares Enteritidis,

Agona e Rissen encontrados a campo também foram encontrados nas carcaças resfriadas após o processo de abate. A partir das coletas de suabes de arrasto nos galpões, houve a recuperação de um maior número de sorovares daqueles encontrados nas carcaças. Os sorovares identificados nos suabes foram Enteritidis, Agona, Rissen, Tennessee, Ohio, enterica O:3,10 e entérica O:6,71.

Os resultados estão de acordo com os trabalhos de Corry et al. (2002) e Bailey et al. (2001) que relatam em suas pesquisas, sorovares detectados a campo aparecendo freqüentemente nas carcaças. Na tabela 10, está demonstrado que os sorovares Agona, Enteritidis e Tennessee são encontrados nas regiões 2 e 3 pertencentes à empresa C. Estes dados podem sugerir que a contaminação inicial das aves seja no incubatório, pois as regiões geográficas são diferentes e a empresa avícola fornecedora das aves é a mesma (CALDWELL et al., 1995). No mesmo sentido Limawongpranee et al. (1999) citam que os sorovares encontrados em incubatório também são encontrados em amostras de campo e podem ser recuperados em carcaças.

A carga microbiana, em especial de salmonelas, presente no intestino das aves em idade de abate, pode ser fixada às penas e pele, no momento do transporte ao abatedouro, em decorrência do aumento da excreção nas fezes devido ao estresse das operações. Deste modo as salmonelas presentes nas identificações em suabes de arrasto, onde são encontrados também os agentes excretados pelas aves, podem aparecer nas carcaças após o processamento. Neste aspecto, pesquisas realizadas para verificação de *Salmonella* nas caixas de transporte de frangos demonstram que os sorovares identificados a campo e sorovares isolados das caixas de transporte são freqüentemente encontrados, nas análises de carcaças pós-processamento no matadouro (SHACKELFORD, 1988; BAILEY, 1988; BAILEY et al., 2001; CORRY et al., 2002, ROY et al., 2002).

Nos EUA algumas medidas diferentes estão sendo adotadas nos abatedouros para redução da contaminação microbiana das aves que chegam ao abate, dentre elas está a utilização de escovas para a limpeza das penas das aves antes da escalda, ação que em 2004, foi adotada por 18,9% dos abatedouros (SILVA,2005).

Estudos e pesquisas indicam a porcentagem de carcaças de frango contaminadas com salmonelas, porém poucos relatos indicam a extensão de contaminação das carcaças positivas (IZAT, et al.,1990a). A determinação da extensão de contaminação, auxilia no

conhecimento do risco de infecções alimentares, por contaminação cruzada a partir frangos e seus derivados, atingirem o homem (JØRGENSEN et al., 2002).

Na determinação do NMP/ml deste trabalho, as médias de células de *Salmonella* recuperadas das carcaças de frangos diferiram entre os meios de cultura BGN e XLT4, usados no plaqueamento das culturas. Analisando as médias de NMP/ml das marcas A, B e C em conjunto, o meio BGN recuperou 1,282 célula/ml diferindo significativamente da média obtida com o meio XLT4 de 2,674 células/ml (Figura 2). O meio XLT4 mostrou-se mais apto a recuperar células de *Salmonella* de carcaças de frango neste experimento, confirmando a seletividade para a bactéria indicada pelos autores que o descreveram (YNTERIAN, 2003).

Os resultados apresentam para as marcas A, B e C contagens diferentes de células de bactérias, o que está de acordo com as pesquisas de Izat et al. (1991b), que relatam variação de NMP entre três marcas estudadas. A correlação entre os NMP para meios de cultura BGN e XLT4 em cada uma das marcas foi analisada. Na marca A e B não foi possível estabelecer correlação, pois o número de amostras positivas não foi suficiente para a interpretação estatística. A marca C apresentou correlação média para a recuperação de células nos diferentes meios (Figura 3). A falta de correlação entre os dois meios pode ser explicada pelas características intrínsecas de recuperação de cada meio de cultura e pela grande variação no NMP recuperado nas amostras, sugerindo que o controle de *Salmonella* na produção e processo de abate desta marca necessita aprimoramento.

O NMP por carcaça determinado neste estudo (Tabela 7), apresenta 45,45% das carcaças contaminadas com 11 a 100 células de *Salmonella* e 54,55% das amostras contaminadas com 101 a 1100 células. Não houveram carcaças contaminadas com 0 a 10 ou < de 1100 células de salmonelas (resultados para o ágar XLT4). No o ágar BGN os resultados foram de 64,70 % de carcaças contaminadas com 11 a 100 células e 35,30% das amostras contaminadas com 101 a 1100 células de salmonelas. Para o ágar BGN também não houveram carcaças contaminadas com 0 a 10 ou < de 1100 células de salmonelas. Os resultados de MNP/carcaças encontrados diferem das pesquisas de vários autores, que relatam ser muito baixo o número de células de *Salmonella* que contaminam uma carcaça, ou seja, <100 NMP/carcaça (BOKANYI et al.,1990; IZAT et al., 1990a; WHITMORE,1993; NASCIMENTO, 1995; CARRAMIÑANA et al., 1997; CARDOSO et

al., 2000). Os resultados reportados por tais autores podem divergir em função das metodologias de contagem utilizadas e do tipo de amostra, no caso, frangos congelados ou resfriados. Um estudo conduzido por Uyttendaele et al. (1998) analisaram carcaças de frangos resfriadas, ao longo de quatro anos, por uma metodologia semi-quantitativa e os resultados foram discriminados como carcaças não contaminadas, baixa contaminação (1 ufc/g ou 100 cm² ou 25 cm²) e alta contaminação (>1 ufc/cm² ou g), deste modo a descrição dos resultados de quantificação mostra-se pouco acurada em comparação com a descrição pela metodologia empregada neste trabalho.

Esta pesquisa foi baseada na metodologia de Dufrenne et al. (2001), porém os resultados deste trabalho diferem dos encontrados pelos autores. Tais autores citam menores níveis de contaminação das carcaças, ou seja, 89% das carcaças apresentaram contaminação de 0 a 10 células; 9% delas níveis de 11 a 100 células, e, apenas 2% de carcaças contaminadas com >1100 células de *Salmonella*, sendo estes valores de NMP determinados a partir do meio de cultura BGN. A maior porcentagem de carcaças contaminadas com >100 células no presente estudo pode ser explicada, possivelmente, por alguns fatores principais que incluem o volume de enxágüe das carcaças utilizados no presente trabalho (menor que o volume utilizado pelos autores), promovendo aumento da concentração das células presentes na carcaça e promovendo menor desperdício de água de enxágüe (COX et al., 1981). Contagens com maiores diferenças foram encontradas nas comparações dos resultados descritos pelos autores, frente aos resultados obtidos a partir do meio XLT4. Diferença que pode ser atribuída aos fatos de menor volume de solução para enxágüe utilizada nas amostra e maior seletividade para *Salmonella* do meio XLT4, demonstrado na decorrência do trabalho com as carcaças de frango resfriadas.

Outro fator que deve ser levado em consideração quando analisado os maiores valores de NMP encontrados na presente pesquisa é o processo de abate das aves, visto que, já anteriormente citados, os níveis de cloro do *chiller* difere entre os países e as concentrações de cloro livre podem afetar diretamente a contagem dos microrganismos. Deste modo, pode ser sugerido que mais pesquisas sejam realizadas neste contexto, para que um perfil de quantificação de *Salmonella* seja realizado com amostras sob os sistemas de inspeção nacional de carcaças.

A realização de ensaio imunoenzimático (kits SALVIA) em 150 carcaças apresentou 11,3% de positividade para *Salmonella* e pesquisa com microbiologia convencional, nas mesmas amostras, apresentou 12,7% de positividade. Entre os dois kits utilizados, os percentuais de amostras falsos positivos foram 8,0% e falsos negativos 9,3% (Tabela 8).

Os resultados discordam dos encontrados por Dickel (2004) na utilização do mesmo teste para carcaças de frango, o qual revelaram 10% de positividade para *Salmonella* pelo kit SALVIA e 20% de positividade pelo método microbiológico convencional. Lambrini (1990 apud DICKEL, 2004) relata concordância de resultados entre o kit SALVIA e o teste microbiológico de 95% e Paula et al. (2002) 75% de concordância.

A ocorrência de resultados falsos positivos e falsos negativos é influência por fatores referentes ao kit e às amostras (BEUMER, 1991), assim o percentual de 8,0% de resultados falso positivos encontrados neste experimento pode ser explicado por possível contaminação cruzada com outras enterobactérias presentes na superfície dos frangos. Tal fato está de acordo com revisões de microbiologia da carcaça de frango (SILVA, 1996) e com Paula et al. (2002), os quais constataram que as amostras de alimentos (frango, carnes e peixes) deveriam ser submetidas a um pós-enriquecimento adequado para melhor desempenho do teste de ELISA na recuperação de salmonelas, devido à grande flora acompanhante nas carnes.

Os resultados falsos negativos poderiam ser explicados pelo número de células no enxágüe inicial das carcaças, pois nas amostras que apresentaram resultados negativos no SALVIA, 85,7% continham de 0 a 5 células de *Salmonella* determinadas na pesquisa do NMP. Esta explicação está de acordo com Flowers et al. (1988) quando inocularam dois níveis de contagem de células de *Salmonella*, um nível descrito como baixo 0-5 células/25g de carne e um alto nível de contaminação 10-50 células/25g, para a avaliação do kit SALVIA. As taxas de detecção foram de 44% com baixo nível de inoculação e 93% com alto nível de inoculação, ou seja, mesmo com um alto nível de inoculação em 7% das amostras não foi detectada a presença de *Salmonella*. Pode ser sugerido a partir dos resultados, que o pós-enriquecimento para amostras de carcaças de frango, provavelmente não esteja sendo suficiente para a multiplicação necessária das células a um nível de detecção pelo kit testado.

Na utilização dos dois kits SALVIA não houve relação estatisticamente significativa entre os resultados gerados pelos mesmos. Tal fato demonstra que os resultados independem do kit utilizado e está de acordo com Beumer (1991) e Mansfield; Forsythe (2001) que relatam diferentes kits possuírem diferentes especificidades e sensibilidades na detecção de *Salmonella*, isso devido à ocorrência de resultados falsos negativos e resultados falsos positivos influenciados por fatores referentes aos componentes do kit e às amostras e microrganismos pesquisados.

Na determinação do perfil de resistência a antimicrobianos das 13 amostras de *Salmonella*, os dados mostram resistência a antimicrobianos das classes β -lactâmicos (amoxicilina e penicilina), tetraciclina (clortetraciclina), aminoglicosídeos (estreptomocina), macrolídeos (josamicina e eritromicina), polimixina (polimixina B), quinolona (enrofloxacina) e lincosamida (lincomicina) (Tabela 11). O perfil de resistência dos sorovares às classes citadas está demonstrado na Tabela 12.

No presente estudo, a resistência a estreptomocina (15,8%) está de acordo com os resultados de Silva;Duarte (2002), Wilson (2004) e Oliveira et al.(2004), porém o percentual encontrado para amoxicilina de 30,7%, é maior do que a resistência à mesma citada por Silva; Duarte (2002).

As tetraciclinas têm sido uma das classes de antimicrobianos mais usadas terapêuticamente em animais de produção (WILSON, 2004) e esperava-se um alto nível de resistência. Nesta pesquisa foram encontradas 23,07% das cepas apresentando resistência.

Por outro lado, as quinolonas são usadas como uma das drogas de escolha no tratamento de infecções entéricas em humanos e seu uso na indústria avícola são citados como inapropriado, devido a possibilidade de resistência cruzada com quinolonas usadas em humanos. A incidência de cepas de *Salmonella* quinolona-resistentes em animais e humanos, na Europa, aumentou substancialmente nos anos consecutivos à liberação de fluorquinolonas como a enrofloxacina, para o uso em veterinária (GUTIÉRRES;LOPÉZ, 2001). Neste estudo, foram encontradas 69,2% de cepas resistentes a enrofloxacina, porém outras duas quinolonas apresentaram cepas com 100% de sensibilidade: norfloxacina e ciprofloxacina, apesar de vários autores relatarem cepas isoladas de carcaças de frangos resistentes a ciprofloxacina e gentamicina e sulfas (LARKIN et al., 2004; MOREIRA;MORAES, 2002; OLIVEIRA et al., 2005; WILSON, 2004). Cepas resistentes à

outra classe de antimicrobianos de eleição para tratamento de gastroenterites graves em humanos, as cefalosporinas, também não foram encontradas.

Todas as cepas apresentaram suscetibilidade a neomicina, fosfomicina, espectinomomicina, ceftiofur, colistina, florfenicol, sulfadiazina e sulfametoxazole, resultados que estão de acordo com Molla et al. (2003), Moreira;Moraes (2002), Oliveira et al. (2005) e Silva;Duarte (2002), além de suscetibilidade às associações de fármacos testadas, exceto a EST+PEN que obteve duas cepas com resistência.

Os resultados do presente estudo indicam a importância de frangos como potencial fonte de cepas de *Salmonella* resistentes e multi-resistentes a antimicrobianos. Contudo, a relativa importância e contribuição destes animais para o problema de resistência antimicrobiana em humanos é difícil avaliar. Os resultados também mostram a necessidade de adoção de estratégias para redução de riscos de contaminação dentro da cadeia alimentar, embasados no prudente uso das drogas antimicrobianas, a fim de prevenir e diminuir o desenvolvimento e a difusão de resistências,

A contaminação inicial de *Salmonella* em frangos é um problema na contaminação cruzada, principalmente nos processos de abate, nos pontos de depenagem, evisceração e *chiller*. Uma vez os frangos contaminados, ao saírem do abatedouro para o consumo, as mãos dos manipuladores e utensílios de cozinha promovem a dispersão do patógeno a alimentos não contaminados (UYTENDAELLE,1998) e os processos de preparo dos alimentos podem não eliminar todas as salmonelas, visto que diferentes sorovares possuem diferentes resistências aos processos térmicos (DOYLE; MAZZOTTA 2000; TAYLOR-ROBINSON et al., 2003; SHERRY et al., 2004).

Assim, não havendo um consenso a respeito da dose infectante de células de *Salmonella* para humanos e sabendo-se que os tratamentos térmicos utilizados nas indústrias de alimentos e na cocção dos alimentos, ocasionalmente podem permitir que salmonelas sobrevivam, conhecer a extensão da contaminação por *Salmonella* nos alimentos é de fundamental importância, tanto para quantificação do risco de contaminação cruzada quanto para adoção de medidas de controle e redução do patógeno nos vários níveis da cadeia alimentar.

6 CONCLUSÕES

- 1- O NMP encontrado nas carcaças de frangos resfriadas, obteve uma média de aproximadamente 2,7 células de *Salmonella* por mL e >100 células de *Salmonella* por carcaça em, ou seja, 54,55% das amostras contaminadas com 101 a 1100 NMP/ carcaça.
- 2- O percentual de contaminação por salmonelas nas carcaças foi de 12,2%, aproximando-se do percentual de positividade nos suabes de arrasto, 15,8%. Os sorovares de *Salmonella* encontrados a campo também foram encontrados nas carcaças de frango analisadas após o processo de abate.
- 3- O meio de cultura ágar XLT4 foi mais eficiente que o ágar BGN no isolamento de *Salmonella* a partir de carcaças de frangos resfriadas.
- 4- Os kits de ELISA (Tecra[®] *Salmonella* VIA), tiveram menor taxa de detecção de *Salmonella* a partir de carcaças de frangos, frente ao teste microbiológico convencional.
- 5- As marcas comerciais analisadas apresentaram diferentes frequências e números de salmonelas nas carcaças de frangos resfriadas.
- 6- As cepas de salmonelas isoladas das carcaças de frangos resfriadas apresentaram multi-resistência a antimicrobianos.
- 7- Carcaças de frango resfriadas podem chegar ao consumidor com um alto nível de contaminação por salmonelas, o que justifica a adoção de métodos de controle e prevenção por parte das Empresas, com a fiscalização do Ministério da Agricultura.
- 8- O sorovar Enteritidis presente nas amostras de suabes e, particularmente nas carcaças de frangos resfriadas, ressalta a necessidade de controle do processo de produção e abate, tendo em vista a importância deste sorovar na promoção de doença em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. S. Integrated colonization control of *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, v. 67, p. 928-932, 1988.

BAILEY, J. S.; STERN, N. J.; FEDORKA-CRAY, P.; et al. Sources and movement of *Salmonella* through integrated poultry operations: a multistage epidemiological investigation. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 11, p. 1690-1697, 2001.

BARROW, P. A. *Salmonella* em avicultura-problemas e novas idéias sobre possibilidades de controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, v. 1, p. 9-16, jan/abr. 1999.

BARROW, P. A. A *Salmonella* control-past, present and future. **Avian Pathology**, v. 22, p. 651-659, 1993.

BAUER K. M. M.; SHERRIS, J. C.; et al Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, v. 45, p. 493-496. 1966.

BERCHIERI J. A.; MACARI, M. **Doença das aves.** Campinas: FACTA, 2000. p. 186.

BEUMER, R. R.; BRINKMAN, E.; ROMBOOTS, F. M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 363-374, 1991.

BOKANY, R. P.; STEPHENS, J. F.; FOSTER, D. N. Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcass or parts. **Poultry Science**, v. 69, p. 492-598, 1990.

BOZIARIS, I. S.; ADAMS, M. R. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 715-724, 2001.

BRASIL, 1995. PLANO NACIONAL DE SANIDADE AVÍCOLA (PNSA). Portaria Nº 8 de 23 de janeiro de 1995. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária. Método analítico de carcaça de aves e pesquisa de *Salmonella* . Diário Oficial da União.1995.

BRASIL, 1998. Portaria DAS nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico de Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Diário Oficial da União de 26/11/98. Seção I, 31p.

BRASIL, 2003. Portaria nº 182 de 17 de setembro de 2003. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária. Análise Microbiológica de Alimentos. Diário Oficial da União. 2003.

BRYAN, F. L.; DOYLE, M. P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 3, p. 326-344, mar. 1995.

BYRD, J. A.; DeLOACH, J. R.; CORRIER, D. E.; et al. Evaluation of *Salmonella* serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. **Avian Disease**, v. 43, p. 39-47, 1999.

CAFFER, M. I.; EIGUER, T. *Salmonella* Enteritidis in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 15-19, 1994.

CALDWELL, D. J.; HARGIS, B. M. CORRIER, D. E.; et al. Evaluation of persistence and distribution of *Salmonella* serotype isolation from poultry farms using drag swab sampling. **Avian Disease**, v. 39, p.617-621, 1995.

CALDWELL, D. J.; HARGIS, B. M.; CORRIER, D. E.; et al. Predictive value of multiple drag swab sampling for detection of *Salmonella* from occupied or vacant poultry houses. **Avian Disease**, v. 38, 461-466, 1994.

CAPITA, R.; ASTORGA, M. A.; CALLEJA, C. A.; et al. Occurrence of Salmonellae in retail chicken carcasses and their products in Spain. **International Journal of Food Microbiology** v. 81, p. 169-173, 2003.

CARRAMIÑANA, J. J.; YANGÜELA, J.; BLANCO, D.; et al. *Salmonella* incidence and distribution of serotypes throughout processing in a Spanish poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 11, p. 1312-1317, 1997.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G.M.; et al. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 1, jan/jun. 2000.

CARR, L. E.; MALLINSON, E. T.; TATE, C. R.; et al. Prevalence of *Salmonella* in broiler flocks: effect of litter water activity, house construction and watering devices. **Avian Disease**, v. 39, p. 39-44, 1995.

CDC, 2004. Disponível em <[URL:http://www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)> Acesso em maio, 2004.

CORRY, J. E. L.; ALLEN, V. M.; HUDSON, W. R.; et al. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. **Journal of Applied microbiology**, v. 92, p. 424-432, 2002.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brasil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, p. 342-346, dec. 2002.

COX, N.A.; THOMSON, J. E., BAILEY, J.S. Sampling of broiler carcass for *Salmonella* whit low volume water rinse. **Poultry Science**, v.60, p. 768-770, 1981.

DeMAN, J. C. MNP tables, corrected. **European Journal Applied of Microbiology**. V.17, p. 301-305. 1983.

DICKEL, E. L. **Tese de Doutorado**: utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2004. 137p.

DIFCO MANUAL. **Dehydrated culture media reagents for microbiology**. 20.ed. Detroit: 1984. 115p.

.DOYLE, M. P.; CLIVER, D. O. *Salmonella*. In: CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne Disease**. San Diego: Academic Press, 1990.

DOYLE, M. E.; MAZZOTA, A. S. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 6, p. 779-795, 2000.

DUFRENNE, J.; RITMEESTER, W.; VAN ASCH, E. D.; et al. Quantification of the contamination of chicken and chicken products in The Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. **Journal of Food Protection**. v. 64, n. 4, p. 538-541, 2001.

EVERIS, L. Injured bacteria in foods. **Nutrition & Food Science**, v. 31, n. 2, p. 84-87, 2001.

FANTASIA, M.; FILETICI, E. *Salmonella* Enteritidis in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 7-13, 1994.

FANTASIA, M.; FILETICI, E.; ANASTACIO, M. P.; et al. Italian experience in *Salmonella* Enteritidis 1978-1988: characterization of isolates from food and man. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 353-362, 1991.

FRASIER, M. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4 ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.

FLORES, M. L. **Tese de Doutorado**: avaliação da técnica da reação em cadeia pela polimerase na detecção de *Salmonella* sp em ovos de galinhas artificialmente contaminados, em ovos comerciais do tipo colonial e em alimentos a base de ovos, envolvidos em surtos de infecções alimentares. Porto Alegre.: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2001.

FLOWERS, R. S.; KLATT, M. J.; KEELAN, S. L. Visual immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.71, n.5, p.973-980, 1988.

GAST, R. K. Detecting infections of chicken with recent *Salmonella* Pullorum isolates using standard serological methods. **Poultry Science**, v.76, p. 17-23, 1997.

GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C. C. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in The Republic of Ireland, **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 21-31, 2002.

GLÓSNIKA, R.; KUNIKOSKA, D. The epidemiological situation of *Salmonella* Enteritidis in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p. 143-150, 2002.

GUTIÉRREZ, J. A. O.; LÓPEZ, R. F. Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. **Revista Española de Salud Pública**, v. 75, p. 313-320, 2001.

HOFER, E.; REIS, E. M. F. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1962 to 1991. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 36, n. 1, p. 7-9, 1994..

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, p. 55-62, abr/jun. 1997.

HOLT, J. G. **Bergey's: manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Williams, 1994, p. 186-7.

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, 1991a.

IZAT, A. L.; YAMAGUCHI, W.; KANIAWATI, S.; et al. Use of consecutive carcass rinses and a most probable number procedure to estimate *Salmonella* contamination of inoculated broilers. **Poultry Science**, v.70, p. 1448-1471, 1991b.

JAWETZ, E.; MELENICK, J. L.; ADELBERG, G. A. **Microbiologia Médica**. 158.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. p. 245-248.

JØRGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLIAMS, S.; et al. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p. 151-164, 2002.

KELLY, L.; ANDERSON, W.; SNARY, E. **Exposure assessment of *Salmonella* sp in broiler**: preliminary report- MRA 00/05. In: JOINT FAO/WHO EXPERT CONSULTATION OF RISK ASSESSMENT OF MICROBIOLOGICAL HAZARDS IN FOODS, 2000, Rome. [Rome]: FAO, 2000. p. 66-85.

KINGSTON, D. J. Comparison of culturing drag swabs and litter for identification of infections with *Salmonella* spp. in commercial chicken flocks. **Avian Disease**, v. 25, n. 2, p. 513-516, 1980.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P. **Risk profile: *Salmonella* (non typhoid) in poultry (whole and pieces)** October 2002. INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND RESEARCH LIMITED. Disponível em: <URL [http:// www.esr.cri.nz](http://www.esr.cri.nz)> Acesso em: 01 dez. 2004.

LARKIN, C.; POPPE, C.; McNAB, B.; et al. Antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 3, p. 448-455, 2004.

LAZARO, N. S.; TIBANA, A.; HOFER, E. *Salmonella* spp. in healthy swine and abattoir environments in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9, p. 1029-1033., 1997.

LÊ MINOR, L.; VÉRON, M. **Bacteriologie Medicale**. Flammarion Medicine Sciences. Paris, 1982. 773p.

LIMAWONGPRANEE, S.; HAYASHIDANI, H.; OKATANI, A.; et al. Prevalence and persistence of *Salmonella* in broiler chicken flocks. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 61, n. 3, p. 255-259, 1999.

LOGUE, C. M.; SHERWOOD, J. S.; OLAH, P. A.; et al. The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. On freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, p. 16-24, 2003.

MANSFIELD, L. P.; FORSYTHE, S. J. The detection of *Salmonella* serovars from animal feed and raw chicken using a combined immunomagnetic separation and ELISA method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, p. 361-366, 2001.

MOLLA, B.; MESFIN, A.; ALEMAYEHU, D. Multiple antimicrobial-resistant *Salmonella* serotypes isolated from chicken carcass and giblets in Debre Seit and Dais Ababa, Ethiopia. **Ethiopia Journal Health Development**, v. 17, n. 2, 2003.

MOREIRA, M. A. S.; MORAES, C. A. Resistance to antimicrobials in Gram-negative bacteria isolated from broiler carcasses. **Arquivo Brasileiro de medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n. 1, 2002.

MORENO, M. A.; DOMINGUEZ, L.; TESHAGER, T.; et al. Antibiotic resistance monitoring: the Spanish program. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 14, p. 285-90, 2000.

MOTA, C. C. S.; VIEIRA, H. R. A.; PUZYNA, I. P.; et al. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil/julho de 1981. **Revista Higiene Alimentar**, v. 2, p. 123-131, 1983.

NASCIMENTO, V. P. Salmonelose aviárias: uma revisão. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE MATRIZES DE CORTE,1., 1995, Chapecó. **Anais**. Chapecó: Associação Catarinense de Avicultura,1995. p. 51-61.

NASCIMENTO, V.P., OLIVEIRA, S.D., RIBEIRO, A.R., et al. Identificação de sorovares de *Salmonella* em cortes e carcaças de frangos. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1997, Rio de Janeiro, RJ. **Anais**. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, v.1, 344p. p.287

NASCIMENTO, V. P. Salmonelose paratíficas: uma revisão e situação atual. In: SIMPÓSIO DE TÉCNICO DE PRODUÇÃO DE OVOS - APA,6., 1996, São Paulo. **Anais**. São Paulo: APA,1996. p. 93-116.

NASCIMENTO, V. P. Monitorização em *Salmonella*. **Revista Sanidade Avícola**. Porto Alegre. Disponível em <[URL:http://www.avisite.com.br](http://www.avisite.com.br)> Acesso em 25 out. 2003.

NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R.; CARDOSO, M. O. Qualidade microbiológica dos produtos avícolas. In: II SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA DA ASSOCIAÇÃO GOIANA DE AVICULTURA E ESCOLA DE VETERINÁRIA DE UFG. **Anais**. 1996. p. 13-17.

NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, approved standard. **7th ed. Document M2-a7, Wayne, Pa, 2000.**

OLIVEIRA, S. D.; FLORES, F. S.; SANTOS, L. R. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 297-305, 2005.

OLSEN, S. J.; BISHOP, R.; BRENNER, F. W.; et al. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 753-761, 2001.

PAULA, A. M. R.; GELLI, D. S.; LANDGRAF, M.; et al. Detection of *Salmonella* in foods using Tecra *Salmonella* VIA and Tecra *Salmonella* UNIQUE rapid immunoassays and a cultural procedure. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 3, p. 552-555, 2002.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**. v. 32, n. 5, p. 477-83, 1998.

PLAUT, A. G. Clinical pathology of foodborne disease: notes on the patient with foodborne gastrointestinal illness. **Journal of Food Protection**. v. 63, n. 6, p. 822-26, 2000.

POOPE, C. *Salmonella* Enteritidis in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 1-5, 1994.

POOPE, C. Salmonellosis in poultry and people. **Supplement of World Poultry – Misset**, p. 13-14, may. 1996.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. **Antigenic Formulas of *Salmonella* Serovars. 7^o Revisión.** WHO COLLABORATING CENTER FOR REFERENCE AND RESEARCH ON *Salmonella* INSTITUTE PASTEUR, Paris France, 1997.

PRAT, S.; FERNANDEZ, A.; FICA, A.; et al. Tipificación fágica de aislados de *Salmonella* Enteritidis de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 9, n. 1, p. 7-12, 2001.

ROY, P.; DHILLON, A. S.; LLOYD, L. H.; et al. Results of *Salmonella* isolation from poultry products, poultry, poultry environment, and other characteristics. **Avian Disease**, v. 46, p. 17-24, 2002.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI, A. J.; FERNANDES, S. A.; et al. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 39-42, 2000.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; et al. Phagetypes of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical food samples, and from broiler carcasses in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 45, n. 1, p. 1-4, jan/feb. 2003.

SANTOS, L. R. **Tese de Doutorado**: fagotipagem e análise por RAPD/PCR (DNA polimórfico amplificado ao acaso) de amostras de *Salmonella* Enteritidis isolada de materiais de origem avícola e de alimentos e humanos envolvidos em casos de toxinfecções alimentares. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2001, 178p.

SHACKELFORD, A. D. Modifications of processing methods to control *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, v. 67, p. 933-935, 1988.

SHERRY, A. E.; PETERSON, M. F.; MADDEN, R. H. Comparison of 40 *Salmonella enterica* serovars injured by thermal, high-pressure and irradiation stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 887-893, 2004.

SILVA, E. N. *Salmonella* Enteritidis em avicultura, o que de prático podemos fazer? In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1996, Curitiba. **Anais**. Campinas: FACTA, 1996. p. 207-210.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, v. 4, n.2, p. 085-100, may/ago. 2002.

SILVA, E. N.; Medidas gerais de controle de Salmonelas em frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos, SP. **Anais**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. v. 2. p. 229-237.

SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frango. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, n.58, out. 1998.

SIMMONS, M.; FLETCHER, D. L.; CASON, J. A.; et al. Recovery of *Salmonella* from retail broilers by a whole-carcass enrichment procedure. **Journal of Food Protection**. v. 66, n.3, p. 446-450, 2003.

SNOYEMBOS, G. H. Pullorum disease. In: HOFSTADS, M.S. **Disease of Poultry**, 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1984. p. 66-79.

SOUSA, A. E. S.; SOUSA, J. A.; COSTA, M. M. R.; et al. Síndrome de reiter: relato de caso. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, n. 3, p. 323-330, 2003.

TAYLOR-ROBINSON, J. D.; CHILD, M.; PICKUP, R.; et al. Cell-cell interactions influence resistance and survival of *Salmonella* serotype Typhimurium to environmental stress. **Journal Applied Microbiology**, v. 94, p. 95-102, 2003.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M. Prevalência de *Salmonella* Enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 107, p. 52-55, abr. 2003.

UBA. União Brasileira de Avicultura: avaliação da avicultura brasileira em 2004 e perspectivas para 2005. Disponível em: <URL: [http:// www. uba.org.br](http://www.uba.org.br)> Acesso em: 02 jan. 2005.

USDA, Food Safety and Inspection Service. FSIS issues: alert on the importance of cooking and handling ground beef. **FISIS Alert**, Washington, D.C. p. 1-3.2004. Disponível em <URL: [http:// www.fsis.usda.gov](http://www.fsis.usda.gov)> Acesso em: 26 fev. 2004.

UYTTENDAELE, M. R.; DEBEVERE, J. M.; LIPS, R. M.; et al. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p. 1-8, 1998.

WHO. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report and proceedings of a WHO meeting. Geneva, Switzerland, 2-5 june 1998. **WHO/EMC/ZDI/98.12. Geneva, 1998**

WILSON, I. G. Antimicrobial resistance of *Salmonella* in raw retail chickens, imported chicken portions, and human clinical specimens. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1220-1225, 2004.

WHITTMORE, A. D. A modified most probable number technique to enumerate total aerobes, enterobacteriaceae and *Salmonella* on poultry carcass after whole rinse procedure. **Poultry Science**, v. 72, p. 2353-2357, 1993.

YANG, H.; LI, Y.; JOHNSON; M. G. Survival and death of *Salmonella* Typhimurium and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 6, p. 770-776, 2001.

YNTERIAN, C. G. *Salmonella*. **Internews Industrial**. v. 3, n. 5, p. 1, 2003. Disponível em: <URL: [http:// www.interlabdist.com.br.htm](http://www.interlabdist.com.br.htm)> Acesso em 25 nov. 2003.

ANEXO A – Tabela NMP/mL e cálculo de NMP/carça.

Tabela NMP para 3 x 1, 3 x 0,1 e 3 x 0,01 g (ml)

Nº	result.	positivos	NMP	Categoria dos nºs de testes					Limites de confiança			
				1	2	3	5	10	≥95%	≥95%	≥99%	≥99%
0	0	0	<0.30						0.00	0.94	0.00	1.40
0	0	1	0.30	3	2	2	2	1	0.01	0.95	0.00	1.40
0	1	0	0.30	2	1	1	1	1	0.01	1.00	0.00	1.60
0	1	1	0.61	0	3	3	3	3	0.12	1.70	0.05	2.50
0	2	0	0.62	3	2	2	2	1	0.12	1.70	0.05	2.50
0	3	0	0.94	0	0	0	0	3	0.35	3.50	0.18	4.60
1	0	0	0.36	1	1	1	1	1	0.02	1.70	0.01	2.50
1	0	1	0.72	2	2	1	1	1	0.12	1.70	0.05	2.50
1	0	2	1.1	0	0	0	3	3	0.4	3.5	0.2	4.6
1	1	0	0.74	1	1	1	1	1	0.13	2.00	0.06	2.70
1	1	1	1.1	3	3	2	2	2	0.4	3.5	0.2	4.6
1	2	0	1.1	2	2	1	1	1	0.4	3.5	0.2	4.6
1	2	1	1.5	3	3	3	3	2	0.5	3.8	0.2	5.2
1	3	0	1.6	3	3	3	3	2	0.5	3.8	0.2	5.2
2	0	0	0.92	1	1	1	1	1	0.15	3.50	0.07	4.60
2	0	1	1.4	2	1	1	1	1	0.4	3.5	0.2	4.6
2	0	2	2.0	0	3	3	3	3	0.5	3.8	0.2	5.2
2	1	0	1.5	1	1	1	1	1	0.4	3.8	0.2	5.2
2	1	1	2.0	2	2	1	1	1	0.5	3.8	0.2	5.2
2	1	2	2.7	0	3	3	3	3	0.9	9.4	0.5	14.2
2	2	0	2.1	1	1	1	1	1	0.5	4.0	0.2	5.6
2	2	1	2.8	3	2	2	2	1	0.9	9.4	0.5	14.2
2	2	2	3.5	0	0	0	0	3	0.9	9.4	0.5	14.2
2	3	0	2.9	3	2	2	2	1	0.9	9.4	0.5	14.2
2	3	1	3.6	0	3	3	3	3	0.9	9.4	0.5	14.2
3	0	0	2.3	1	1	1	1	1	0.5	9.4	0.3	14.2
3	0	1	3.8	1	1	1	1	1	0.9	10.4	0.5	15.7
3	0	2	6.4	3	3	2	2	2	1.6	18.1	1.0	25.0
3	1	0	4.3	1	1	1	1	1	0.9	18.1	0.5	25.0
3	1	1	7.5	1	1	1	1	1	1.7	19.9	1.1	27.0
3	1	2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3	1	3	16	0	0	0	3	3	3	38	2	52
3	2	0	9.3	1	1	1	1	1	1.8	36.0	1.2	43.0
3	2	1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3	2	3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3	3	0	24	1	1	1	1	1	4	99	3	152
3	3	1	46	1	1	1	1	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3	3	3	>110	-	-	-	-	-			-	

De Man (1983).

Fórmula para cálculo do NMP por carcaça:

Peso da carcaça x NMP(tabela)

————— =NMP/carcaça
 maior volume utilizado
 nas amostras

Peso das carcaças e NMP/mL em agar XLT4 e BGN utilizado nos cálculos.

Amostra	Peso da carcaça (g)	NMP/mL XLT4	NMP/mL BGN
1	083,0	3,5	0,92
2	1861,8	0,36	0,92
3	2203,3	0,36	0,92
4	2475,6	9,3	2,1
5	2253,6	2,1	2,1
6	2423,1	2,1	1,5
7	2212,3	2,1	1,5
8	2168,8	0,36	0,36
9	2512,8	2,3	2,3
10	2859,9	1,5	1,5
11	2060,1	7,5	2,3
12	2130,9	7,5	2
13	1943,9	4,3	2,3
14	1994,3	1,6	-
15	1764,8	0,36	-
16	2039,7	2,3	-
17	2332,0	0,36	-
18	1967,8	1,1	0,36
19	1837,0	1,1	7,5
0	1177,4	0,36	0,36
21	1445,3	0,36	0,36
22	1423,8	0,36	-

ANEXO B – Resumos Apresentados no XVII Congresso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología. 17 - 21 de Octubre de 2004. Buenos Aires, Argentina

TITULO: NUMBERS OF *Salmonella* ISOLATED FROM BROILER CARCASSES.

Autores: A Borsoi (1), O Rodrigues (1), VP Nascimento (1)

Institucion: (1) Center for Diagnostics and Research in Avian Pathology, Faculty of Veterinary Medicine. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, E-mail :anderliseb@y a hoo .com. br

Foodborne infections caused by *Salmonella* are one the most frequently occurring zoonosis in the industrialized world today. They are also recognized as a being a common cause of human food poisoning outbreaks, and raw poultry is considered to be an important source of these bacteria. *Salmonella* represent an important concern to the public health, not only in developed countries, but also especially in developing ones. This study reports the number of *Salmonella* isolated from eighty refrigerated whole broiler carcasses, wich were produced by Poultry Companies located at Southern Brazil. They are submitted to a microbiological evaluation by MPN (most probable number) method. Whole carcasses were rinsed with 150 ml Buffered Peptone Water (BPW), After washing for 2 min, BPW was divided in nine tubes per sample: 3 x 30 ml. 3 x 3ml and 3 x 0,3ml (the last added 3 ml fresh BPW) and incubated at 37°C for 182h, From BPW cultures, 0,1ml was added to 10ml Rappaport Vassiliades (RV) broth and incubated for 242h at 42°C. After that, RV cultures were streaked on Brilliant-Green Phenol-Red Lactose Sucrose agar (BPLS) and XLT4 agar and incubated 242h at 37°C In addition, an ELISA visual immunoassay was realized according to the manufacture's instruction (TECRA *Salmonella*). The biochemical profile was then verified. The number of *Salmonella* was calculated using MPN tables (United States Department of Agriculture USDA). Using MPN method was found 13 carcasses contaminated (Table 1). All positive samples by MPN method were also positive by ELISA method.

Table 1: MPN index per ml and combinations of positive tubes (on XLT4 agar) in a 3 tube dilution series.

Combination of positives	MPN index	Combination of positives	MPN index
2-2-2	21,0	1-0-0	3,6
1-0-0	3,6	3-0-0	23,0
1-0-0	3,6	2-1-0	15,0
3-2-0	93,0	3-1-0	75,0
2-2-0	21,0	3-1-1	75,0
2-2-0	21,0	3-1-0	64,0
2-2-0	21,0		

*

The risk analysis is one of the most important procedures performed by the poultry industry today. This can help the health authorities in assessing the consumer's risks of acquiring food poisoning from undercooked poultry, and also being able to propose control measures to be adopted by the lindustry.

file:///F:\J\J-%20490.htm

Salmonella ISOLATED AND THEIR ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE FROM BROILER CARCASSES.

A Borsoi (1), O Rodrigues (1), C Mersoni (1), V P Nascimento (1)

(1) Center for Diagnostics and Research in Avian Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.

E-mail: anderiiseb@yahoo.com.br

Each year, foodborne diseases affect many people in the world from which several thousand die. Foodborne pathogens can be present in food and including cattle, poultry, fish and shellfish. Although these animals may appear healthy, their meat or other derived products can be contaminated *Salmonella* or other pathogens. Since the discovery of the growth-promoting disease-fighting capabilities of certain antibiotics, their use became common in livestock. Currently, half of all antibiotics are used to treat sick animals, v» may results in the development of resistance in the livestock. Contaminated meat, meat products and other products can carry these pathogens. In our study the *Salmonella* isolates detected from refrigerated broiler carcasses had antibiotic resistance was verified. The samples antibiotic resistance profile was assessed by the disk diffusion method (Kirby-Bauer method). The thirteen samples were tested against twenty seven antibiotics (Tables land 2).

Table 1: Antibiotics and resistance of *Salmonella* sp from broiler carcasses.

Antibiotic resistance	Resistant samples (total/%)	Antibiotic resistance	Resistant samples (total/%)
Amoxicillin (AMO)	4/13 (30,76)	Josamycin (JOS)	9/13 (69,23)
Clortetracyclin (CLO)	3/13 (23,07)	Lincomycin (LIN)	13/13 (100)
Doxicyclin (DOX)	1/13 (7,69)	Penicillin (PEN)	13/13 (100)
Eritromycin(ERI)	13/13 (100)	Polymixin B (POL B)	1/13 (7,65)
Streptomycin (STR)	2/13 (15,83)	Enrofloxacin (ENR)	9/13 (69,23)
Streptomycin + penicillin	2/13 (15,83)		

Table 2: Antimicrobial resistance profile of *Salmonella* sp from broiler carcass;

Resistant Profile _____	Resistant samples
ERI, JOS, LIN, PEN	03
AMO, CLO, ERI, JOS, LIN, PEN	02
ERI, JOS, LIN, PEN	02
CLO, DOX, EST+PEN, ERI, STR, JOS, LIN, PEN	01
AMO, ERI, JOS, LIN, PEN	01
PEN, AMO, LIN, ERI	02
PEN, LIN, ERI	01
LIN, ENR, EST+PEN, EST, POL B, ERI	01

In the human population the incidence of *Salmonella* is very frequent in se countries. The results show that it is necessary to adopt risk reduction strafe.

ANEXO C – Resumos Publicados no Suplemento 7 da Revista Brasileira de Ciência Avícola.
Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologia Avícolas. 4 - 7 Maio de 2005.
Santos, São Paulo.

PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *SALMONELLA* SP. ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGOS RESFRIADAS

*A Borsoi¹, HS Moraes¹, O Rodrigues², VP Nascimento¹,

¹ Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) - FAVET/UFRGS - Lab. Central - Porto Alegre (RS)

² Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária - (CDPA) - FAVET/UFRGS - Regional' Serra - Garibaldi (RS)

Introdução

Patógenos transmitidos por alimentos (*Salmonella* e outros), presentes em vários pontos da cadeia alimentar, mereceram considerável atenção no Brasil e no mundo a partir da década de 90 devido ao aumento da incidência de bactérias resistentes a antimicrobianos associadas a doenças em humanos. Embora aves e outros animais pareçam saudáveis, sua carne e produtos derivados podem estar carreando tais patógenos. A dificuldade no tratamento de pacientes em hospitais tornou a salmonelose um importante tópico em saúde pública (3). O objetivo deste trabalho foi verificar o perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* isolada de carcaças de frangos resfriadas.

Material e Métodos

O estudo foi realizado a partir da análise de 80 carcaças de frangos resfriadas, produzidas em companhias localizadas no Sul do Brasil, adquiridas em varejos locais. A pesquisa de *Salmonella* foi realizada pelo método de enxágüe da carcaça com 150 ml de água peptonada tamponada (AP), após 2 minutos de enxágüe da carcaça a AP foi encubada a 37°C por 18±2h. Em 10ml de Rappaport Vassiliades (RV) foram adicionados 0,1 ml da cultura em AP e encubado por 28±2h a 42°C. As culturas de RV foram estriadas em ágar verde brilhante com novobiocina e ágar XLT4. Testes bioquímicos e sorológicos foram realizados nas colônias suspeitas. A identificação final das colônias positivas foi realizada na Fundação Osvaldo Cruz. O teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em disco, conforme descrito por Bauer et al (1), sendo o ágar XLT4 usado para controle dos testes. Antimicrobianos β-lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, sulfas, polimixinas, aminoglicosídeos, lincosamidas, quinolonas, cloranfenicol, fosfomicina, cefalosporinas e associações de drogas foram testadas.

Resultados e Discussão

Apresentaram-se positivas para *Salmonella* 13/80 amostras (16,25%). As 13 amostras de *Salmonella* apresentaram 100% de resistência a lincomicina (LIN) e eritromicina (ERI). Resistência de 69,23% a josamicina e enrofloxacina, 30,76% a amoxicilina (AMO), 23,07% a clortetraciclina (CLO); 15,83% a estreptomicina (EST) e estreptomicina + penicilina (EST+PEN) e 7,69% de resistência a doxiciclina (DOX). Todas as cepas apresentaram sensibilidade a ciprofloxacina, neomicina, fosfomicina, espectinomicina, ceftiofur, colistina, florfenicol, sulfadiazina, sulfametoxazole e norfloxacina, além das associações de fármacos testadas, exceto a EST+PEN à qual uma cepa mostrou-se resistente. Os sorovares e o perfil de resistência antimicrobiana estão apresentados na Tabela 1. As tetraciclina têm sido uma das classes de antimicrobianos mais usadas terapêuticamente em animais de produção (4) e esperava-se um alto nível de resistência. Em nosso estudo foram encontradas 30,76% das cepas apresentando resistência. Por outro lado, as quinolonas são usadas como uma das drogas de escolha no tratamento de infecções entéricas em humanos e seu uso na indústria avícola é citado como inapropriado,

devido a possibilidade de resistência cruzada com quinolonas usadas em humanos. A incidência de cepas de *Salmonella* quinolona-reistentes em animais e humanos, na Europa, aumentou substancialmente nos anos consecutivos à liberação de fluoroquinolonas, como a enrofloxacina, para o uso em veterinária (2). Neste estudo, foram encontradas 69,23% de cepas resistentes a enrofloxacina, porém outras duas quinolonas apresentaram cepas com 100% de sensibilidade: norfloxacina e ciprofloxacina. Cepas resistentes à outra classe de antimicrobianos de eleição para tratamento de gastroenterites graves em humanos, as cefalosporinas, também não foram encontradas.

Tabela 1 - Perfil de resistência antimicrobiana e sorovares de *Salmonellas* sp. isoladas de carcaças de frango resfriadas.

SALMONELLA SP.	Nº	ANTIMICROBIANOS RESISTENTES
S. Livingstone	01	ERI, LIN, JOS, POL B
S. Enteritidis	04	ERI, LIN, JOS, ENR
S. Agona	01	ERI, LIN, JOS
S. Agona	01	ERI, LIN, ENR
S. Agona	02	ERI, LIN, AMO
S. Agona	02	ERI, LIN, JOS, AMO, CLT, ENR
S. Agona	01	ERI, LIN, EST, EST+PEN, ENR
S. Agona	01	ERI, LIN, JOS, CLT, EST, EST+PEN, DOX, ENR

Conclusão

Os resultados do presente estudo indicam a importância de frangos como potencial fonte de cepas de *Salmonella* resistentes e multi-resistentes a antimicrobianos. Contudo, a relativa importância e contribuição destes animais para o problema de resistência antimicrobiana em humanos é difícil avaliar. Os resultados também mostram a necessidade da adoção de estratégias para redução de riscos de contaminação dentro da cadeia alimentar, embasados no prudente uso das drogas antimicrobianas, a fim de prevenir e diminuir o desenvolvimento e a difusão de resistências, assim protegendo a saúde do consumidor.

Bibliografia

- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC et al. Am. J. Clin. Pathol. 1966; 45: 493-496.
- Gutiérrez JAO, López RF. Rev. Esp. Salud Publica. 2001; 75: 313-320.
- Moreno MA, Domingues L, Teshager T et al. Int. J. Antimicrob. Agents. 2000; 14: 285-290.
- Wilson IG. J. Food Prot. 2004; 67(6): 1220-1225.

CONTAGEM POR NMP E SOROVARES DE *SALMONELLA* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGOS RESFRIADAS.

*A Borsoi¹, CTP Salle¹, O Rodrigues², VP Nascimento¹,

¹ Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) - FAVET/UFRGS - Lab. Central - Porto Alegre (RS)

² Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária - (CDPA) - FAVET/UFRGS - Regional Serra - Garibaldi (RS)

Introdução

A *Salmonella* é um dos mais importantes patógenos alimentares associados à carne de frango e produtos derivados. Para auxiliar a avaliação de risco em adquirir infecção alimentar via carne de frangos que sofreram cocção inadequada ou através de contaminação cruzada a partir destes, faz-se importante determinar a extensão da contaminação por esses patógenos em carne crua. O método do número mais provável (NMP) é um método indireto para estimar a população bacteriana baseado em probabilidades estatísticas; este método foi utilizado no presente trabalho em carcaças de frango resfriadas a fim de quantificar células de *Salmonella* presentes nas amostras e identificar os respectivos sorovares nelas encontrados.

Material e Métodos

O estudo foi realizado a partir da análise de 180 carcaças de frangos resfriadas, produzidas em companhias da região Sul do Brasil e adquiridas em varejos locais. A contagem de *Salmonella* foi realizada pelo método do número mais provável (NMP) de células bacterianas por mL ou g, descrito por Dufrenne et al. (2). O enxágue das carcaças, foi realizado com 150 mL de água peptonada tamponada (AP) (1) por 2 min. Após o enxágue, a AP foi dividida em nove tubos: 3 x 30 mL, 3 x 3mL e 3 x 0,3mL (aos tubos com 0,3 mL foram adicionados 3 mL de AP) e incubados a 37°C por 18±2h. A partir das culturas de AP, 0,1mL de cada um dos 9 tubos foi adicionado a outros 9 tubos com 10mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV) e incubados por 24±2h a 42°C. As culturas de RV foram esfriadas em ágar verde brilhante com novobiocina e ágar XLT4, resultando 18 placas de cultura por amostra, e incubadas por 24±2h a 37°C (2). Testes bioquímicos e sorológicos foram realizados nas colônias suspeitas. A identificação final das colônias positivas foi realizada na Fundação Oswaldo Cruz.

Resultados e Discussão

Os níveis de contaminação de carcaças por *Salmonella* podem variar em diferentes trabalhos devido a diferentes planos de amostragens e limites de detecção da metodologia utilizada. Em nosso estudo encontramos uma positividade em 12,22% (22/180) das amostras. Percentuais entre 2,9 e 68,6% de positividade para *Salmonella* em carcaças de frango inteiras já foram descritos (4).

Tabela 1 - NMP de *Salmonella* em 22 amostras isoladas de carcaças de frango resfriadas.

NMP (CELULAS/ML)	% (N ⁰ /total)
0-10	0 (0/22)
11 -100	31,81 (7/22)
101 -1100	54,55 (12/22)
>1100	13,63 (3/22)

Usando o método do NMP encontrou-se neste estudo a maior parte das carcaças contaminada com >100 células/mL. Não houve ocorrência de carcaças contaminadas com NMP <10 células/mL (Tabela 1). O NMP encontrado nas amostras analisadas foi superior ao encontrado em experimentos realizados na Hoianda (2), Bélgica (5) e Reino Unido (3). Os sorovares de *Salmonella* isolados das amostras positivas foram Enteritidis, Agona, Rissen, Heidelberg e Livingstone (Tabela 2). Os problemas de toxinfecções alimentares causadas por *Salmonella* são relatados mundialmente e o sorovar Enteritidis tem tido um destaque especial desde a década de 90, quando constatou-se um aumento na ocorrência deste sorovar em casos de gastroenterites em humanos e complicações hospitalares no tratamento das mesmas. O sorovar Rissen tem sido pouco relatado em carcaças de frango e em percentuais menores do que os encontrados nesta pesquisa (5).

Tabela 2 - Sorovares de *Salmonella* e percentual de ocorrência nas amostras isoladas de carcaças de frango resfriadas.

SOROVAR	%
S. Enteritidis	33,33
S. Agona	33,33
S. Rissen	19,04
S Heidelberg	9,54
S. Livingstone	4,76

Conclusão

A contaminação por *Salmonella* em carne de frango pode ser um problema, e o risco de contaminação cruzada gerado pode ser proporcional ao número de células presentes na carne de frango crua (3). Assim, estudos para quantificação do nível de infecção por salmonelas em carcaças de frango auxiliam na avaliação da exposição ao risco, que traduz a necessidade de ações a níveis de indústria e consumidor. A eliminação de *Salmonella* de carcaças de frango e produtos derivados, nas medidas adotadas no abate e processamento, deve ser auxiliada pelo controle da presença do agente à nível de campo e também pela instrução do consumidor.

Bibliografia

- Cox NA, Thomson JE, Bailey. Poultry Science. 1980; 60: 768-770.
- Dufrenne J, Ritmeester W, Asch ED et al. J. Food Prot. 2001; 64: 538-541.
- Jorgensen F, Bailey R, Williams S et al. Int. J. Food Microb. 2002; 76: 151-164.
- Simmons M, Fletchert DL, Cason JA et al. J. Food Prot. 2003; 66(3): 446-450.
- Uyttendaele MR, Debevere JM, Lips RM et al. Int. J. Food Microb. 1998; 40:1-6.

ANEXO D – Declarações dos Trabalhos Apresentados Oralmente na Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologia Avícolas. 4 - 7 Maio de 2005. Santos, São Paulo.



Campinas, 11 de maio de 2005.

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que *Anderlise Borsoi*, autor do trabalho "**Contagem por NMP e Sorovares de Salmonella Isoladas de Carcaças de Frangos Resinadas**" inscrito no Prêmio de Pesquisa Avícola "José Maria Lamas da Silva", na área de *Sanidade*, apresentou oralmente o trabalho no dia 04 de maio durante a **Conferência APINCO'2005**.

Por ser verdade, firmamos o presente.

Ariel Antônio Mendes
Presidente da FACTA

Marcos Macari
Diretor de Cursos e Publicações

FACTA

FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS

Av. Andrade Neves, 2501 - Castelo - Campinas, SP -13070-001 - Fone:(M9) 3243-6555 - Fax:(M9) 3243-8542



Campinas, 11 de maio de 2005.

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que *Anderlise Borsoi*, autor do trabalho "**Perfil de Resistência Antimicrobiana de *Salmonella* SP. Isoladas de Carcaças de Frangos Resfriadas**" inscrito no Prêmio de Pesquisa Avícola "José Maria Lamas da Silva", na área de *Sanidade*, apresentou oralmente o trabalho no dia 04 de maio durante a **Conferência APINCO'2005**.

Por ser verdade, firmamos o presente.

Ariel Antônio Mendes
Presidente da FACTA

Marcos Macari
Diretor de Cursos e Publicações

FACTA

FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS

Av. Andrade Neves. 2501 - Castelo - Campinas. SP -13070-001 - Fone:(19) 3243-6555 - Fax:(19) 3243-8542

ANEXO E – Resumo Apresentado na MOSTRA UFRGS / INOVA UFRGS. 10-14 Maio de 2005. Porto Alegre / RS.

Mostra UFRGS

Resumo dos Trabalhos

Catálogo Eletrônico

CONTAGEM POR NMP E SOROVARES DE SALMONELLA ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGOS RESFRIADAS.

Anderlise Borsoi; Luciane Camargo; Carlos Tadeu Pippi Salle; Hamilton de Souza Moraes; Obiratã Rodrigues; Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Resumo:

A *Salmonella* é um dos mais importantes patógenos alimentares associados à carne de frango e produtos derivados. Para auxiliar a avaliação de risco em adquirir infecção alimentar via carne de frangos que sofreram cocção inadequada ou através de contaminação cruzada a partir destes, faz-se importante determinar a extensão da contaminação por esses patógenos em carne crua. A adaptação de um método de número mais provável (NMP) afim de estimar a população bacteriana baseado em probabilidades estatísticas, foi desenvolvido no presente trabalho em carcaças de frango resfriadas, para quantificar células de *Salmonella* presentes nas amostras. Foram identificados os respectivos sorovares encontrados. O estudo foi realizado a partir da análise de 180 carcaças de frangos resfriadas, produzidas em companhias da região Sul do Brasil e adquiridas em varejos locais. A contagem de *Salmonella* foi realizada pelo método do número mais provável (NMP) de células bacterianas por mL ou g, descrito por Dufrenne et al. e adaptado em volume de meio de cultura para o enxágüe e ágar para isolamento em placa. O enxágüe das carcaças foi realizado com 150 mL de água peptonada tamponada (AP) por 2 min. Após o enxágüe, a AP foi dividida em nove tubos: 3 x 30 mL, 3 x 3mL e 3 x 0,3mL (aos tubos com 0,3 mL foram adicionados 3 mL de AP) e incubados a 37°C por 18±2h. A partir das culturas de AP, 0,1mL de cada um dos 9 tubos foi adicionado a outros 9 tubos com 10mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV) e incubados por 24±2h a 42°C. As culturas de RV foram estriadas em ágar verde brilhante com novobiocina e ágar XLT4, resultando 18 placas de cultura por amostra, e incubadas por 24±2h a 37°C. Testes bioquímicos e sorológicos foram realizados nas colônias suspeitas. A identificação final das colônias positivas foi realizada na Fundação Oswaldo Cruz. Em nosso estudo encontramos uma positividade em 12,22% (22/180) das amostras. Usando o método do NMP encontrou-se neste estudo a maior parte das carcaças contaminada com >100 células/ mL. Não houve ocorrência de carcaças contaminadas com NMP <10 células/mL. Os sorovares de *Salmonella* isolados das amostras positivas foram Enteritidis, Agona, Rissen, Heidelberg e Levingstone. A contaminação por *Salmonella* em carne de frango pode ser um problema, e o risco de contaminação cruzada gerado pode ser proporcional ao número de células presentes na carne de frango crua. Assim, estudos para quantificação do nível de infecção por salmonelas em carcaças de frango auxiliam na avaliação da exposição ao risco, que traduz a necessidade de ações a níveis de indústria e consumidor. A eliminação de *Salmonella* de carcaças de frango e produtos derivados, nas medidas adotadas no abate e processamento, deve ser auxiliada pelo controle da presença do agente à nível de campo e também pela instrução do consumidor. A adaptação da metodologia de NMP (através da redução de meio de cultura para enxágüe e uso de ágar para isolamento com maior seletividade) proporcionou recuperação mais apurada (concentração de células) de *Salmonella* presentes nas carcaças, resultando em menor custos de meios de cultura, maior agilidade no processo laboratorial e melhor retratação do perfil de células presentes.

Palavras Chave: Salmonella. Número mais provável. Carcaça de frango