

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

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DE CARÇAÇAS DE FRANGO DE
CORTE EM MATADOUROS FRIGORÍFICOS ATRAVÉS DO
SEQUENCIAMENTO DE ALTO RENDIMENTO**

Tese de Doutorado

Autor: Hiran Castagnino Kunert Filho

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

Co-orientador: Thales Quedi Furian

PORTO ALEGRE

2020

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

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DE CARCAÇAS DE FRANGO DE
CORTE EM MATADOUROS FRIGORÍFICOS ATRAVÉS DO
SEQUENCIAMENTO DE ALTO RENDIMENTO**

Autor: Hiran Castagnino Kunert Filho

**Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva, especialidade em Sanidade Avícola**

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento
Co-orientador: Thales Quedi Furian

PORTO ALEGRE

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Kunert-Filho, Hiran Castagnino
CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DE CARCAÇAS DE FRANGO
DE CORTE EM MATADOUROS FRIGORÍFICOS ATRAVÉS DO
SEQUENCIAMENTO DE ALTO RENDIMENTO / Hiran Castagnino
Kunert-Filho. -- 2020.

37 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Coorientador: Thales Quedi Furian.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. metagenômica. 2. carcaça. 3. microbioma. 4.
matadouro-frigorífico. 5. frango de corte. I. Pinheiro
do Nascimento, Vladimir, orient. II. Quedi Furian,
Thales, coorient. III. Título.

Hiran Castagnino Kunert Filho

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DE CARCAÇAS DE FRANGO DE
CORTE EM MATADOUROS FRIGORÍFICOS ATRAVÉS DO
SEQUENCIAMENTO DE ALTO RENDIMENTO

APROVADA EM 09 DE ABRIL DE 2020 POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

Orientador e Presidente da comissão

Dr. Thales Quedi Furian (UFRGS)

Co-orientador

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes (UFRGS)

Membro da Comissão

Dra. Karen Apellanis Borges (UFRGS)

Membro da Comissão

Dra. Kelly Cristina Tagliari de Brito (SEAPDR/DDPA/IPVDF-Eldorado do Sul, RS)

Membro da Comissão

Dedico esta tese a minha mãe, Márcia Rousselet Gonçalves, que sempre me incentivou a seguir em frente na minha formação acadêmica!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

AGRADECIMENTOS

A minha família, Márcia (mãe), Hiran (pai) e Felipe (irmão), por acreditarem no meu ideal e incentivarem esta importante etapa da minha formação acadêmica.

Ao meu afilhado, Gustavo, alegria e razão da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento, agradeço imensamente a oportunidade de realizarmos este trabalho juntos e por todos os ensinamentos em sanidade avícola.

Ao meu co-orientador, Dr. Thales Quedi Furian, obrigado pelas orientações prestadas e incentivo ao longo desses 4 anos de convívio.

Aos integrantes do CDPA, Prof. Dr. Vladimir, Prof. Dr. Hamilton, Prof. Dr. Tadeu, Dra. Karen, Dr. Thales, Dr. Sílvio e seu Omar meu muito obrigado pelos conselhos e aprendizados durante este tempo. Vocês foram de suma importância no desenvolver desse trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório do CDPA, Daiane Carvalho, Gabriela Zottis, Caroline Hiller, Renata Sesterhenn, Vivian Lucca, Daiane Wilsmann, Luísa Neukamp Diedrich, Karine Pontin, Brunna de Emery, Bruna Webber e Rafaela Menezes. Obrigado por acreditarem e compartilharem esse momento comigo.

Ao Dr. Benito Guimarães de Brito e a Dra. Kelly Cristina Tagliari de Brito, obrigado pela oportunidade de trabalhar com vocês no Laboratório de Saúde das Aves no IPVDF. Obrigado pela grande confiança e pela amizade.

A Deus por permitir que eu conseguisse concluir mais uma etapa em minha vida e proporcionado o convívio com esse grupo.

RESUMO

Analisar e entender o perfil da comunidade bacteriana das carcaças de frango de corte durante o processo de abate pode ser uma ferramenta útil para a agroindústria avícola produzir alimentos com maior inocuidade. O microbioma do matadouro-frigorífico de frangos de corte tem um grande impacto na segurança do produto final gerado. O manuseio e o consumo de produtos de origem aviária têm sido associados à transmissão de importantes patógenos aos consumidores, como *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Porém outras bactérias patogênicas também podem estar relacionadas com a cadeia avícola. Nos matadouros-frigoríficos, a contaminação da carcaça de frango por bactérias patogênicas pode ocorrer durante todas as etapas do processamento, incluindo abate, sangramento, evisceração, lavagem e refrigeração. Este trabalho tem como objetivo realizar a técnica de sequenciamento de próxima geração de alto rendimento (HT-NGS) para identificar o microbioma presente nas carcaças de frango de corte durante o processo de abate em matadouros-frigoríficos. Foram coletadas 312 carcaças de frango de corte em três matadouros-frigoríficos do Rio Grande do Sul com Serviço de Inspeção Federal (SIF). Também foram coletados 200 mL de água do *chiller* em três pontos distintos (início, meio e fim) do tanque em cada matadouro-frigorífico sendo realizado um *pool* para cada ponto amostrado. O *pool* correspondente a cada ponto foi constituído de 100 mL, sendo deste total 50 mL por ponto amostrado de cada visita. A comunidade microbiana das carcaças de frango foi dominada pelo Reino *Bacteria* em todos os matadouros-frigoríficos. Foram identificados quatro filos, 11 classes, 15 ordens e 22 famílias. No matadouro-frigorífico A foram identificados 20 gêneros e nos matadouros-frigoríficos B e C foram identificados 28 gêneros em cada. No matadouro-frigorífico A foram identificadas 26 espécies e nos matadouros-frigoríficos B e C foram identificadas 37 espécies em cada. No *chiller* foram identificadas 17 espécies e não foi observada nenhuma espécie comum aos três estabelecimentos avícolas. Na área limpa (embalagem final) foram identificadas 21 espécies, sendo a espécie *C. jejuni* a única comum aos três estabelecimentos avícolas. O processo de abate reduziu o número de espécies e a quantidade de sequências identificadas dos microrganismos. O *chiller* não foi capaz de eliminar ou diminuir a quantidade de alguns contaminantes detectados, independentemente do matadouro-frigorífico avaliado. Entre os microrganismos com potencial patogênico detectado, foi observada a presença do *C. jejuni* nos três matadouros-frigoríficos. O microbioma das carcaças de frango de corte foi diferente para todos os matadouros-frigoríficos. Os resultados demonstram que o microbioma associado à carcaça varia conforme o matadouro-frigorífico, bem como de acordo com a origem do lote.

Palavras-chave: metagenômica, carcaça, microbioma, matadouro-frigorífico, frango de corte

ABSTRACT

Analyzing and understanding the profile of the bacterial community of broiler chicken carcasses during the slaughter process can be an useful tool for the poultry industry to produce microbiologically safer food. The microbiome of a broiler slaughterhouse has a great impact on the safety of the final product generated. On the other hand, the handling and consumption of products of avian origin have been associated with the transmission of important pathogens to consumers, such as *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. However, other pathogenic bacteria may also be related to the poultry chain. In slaughterhouses, chicken carcass contamination by pathogenic bacteria can occur during all stages of processing, including slaughter, bleeding, evisceration, washing and refrigeration. This work aims at performing the next generation high throughput sequencing technique (HT-NGS) to identify the microbiome present in broiler carcasses during the slaughter process in slaughterhouses. A total of 312 broiler carcasses were collected from three slaughterhouses in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, all served with Federal Inspection Service (SIF). 200 mL of water from the chiller were also collected at three different points (beginning, middle and end) of the chiller tank in each processing plant, with a pool being made for each point sampled. The pool corresponding to each point consisted of 100 mL, of which 50 mL per point was sampled at each visit. The microbial community of chicken carcasses was dominated by the Bacteria Kingdom in all slaughterhouses. Four phyla, 11 classes, 15 orders and 22 families were identified. In slaughterhouse A, 20 genera were identified and in slaughterhouses B and C, 28 genera were identified in each. In slaughterhouse A, 26 species were identified and in slaughterhouses B and C, 37 species were identified in each. In the chiller, 17 species were identified and no species common to the three poultry establishments were observed. In the clean area (final packaging), 21 species were identified, with the species *C. jejuni* being the only one common to the three poultry establishments. The slaughter process reduced the number of species and the amount of identified sequences of microorganisms. The chiller was not able to eliminate or reduce the amount of some contaminants detected, regardless of the slaughterhouse evaluated. As referred, among the microorganisms with pathogenic potential detected, the presence of *C. jejuni* was observed in all three slaughterhouses. The microbiome of broiler carcasses was different for all slaughterhouses. The results demonstrate that the microbiome associated with the carcass can vary according to the slaughterhouse sampled, as well as according to the origin of the batch being processed.

Keywords: metagenomics, carcass, microbiome, slaughterhouse, broilers

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Processo de sequenciamento plataforma Illumina, onde o DNA se liga a adaptadores em ambas às extremidades (*paired-end*) e durante a amplificação forma as “pontes”..... 25

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------|--|
| °C | Graus Celsius |
| μL | Microlitro |
| % | Percentual |
| ABPA | Associação Brasileira de Proteína Animal |
| APPCC | Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle |
| CDPA | Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária |
| DGGE/TGGE | <i>Denaturing or Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante/de Temperatura) |
| DNA | <i>Desoxyribunucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico) |
| dsDNA | <i>Double strand DNA</i> (DNA dupla fita) |
| DTA | Doenças Transmitidas por Alimentos |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Enzimático de Imunoabsorção) |
| emPCR | PCR em Emulsão |
| FAMV | Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária |
| FAVET | Faculdade de Veterinária |
| FISH | <i>Fluorescent in situ hybridization</i> (Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>) |
| Gb | Gigabyte |
| IPVDF | Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor |
| HT-NGS | <i>High Throughput Next Generation Sequencing</i> (Sequenciamento de Próxima Geração de Alto Rendimento) |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| Min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| NGS | <i>Next Generation Sequencing</i> (Sequenciamento de última geração) |
| pb | Par de bases |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase) |
| PGM | <i>Personal Genome Machine</i> (Máquina Pessoal de Genoma) |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PNCP | Programa Nacional de Controle de Patógenos |

| | |
|---------|---|
| qPCR | PCR quantitativo |
| RIISPOA | Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico) |
| rRNA | RNA ribossômico |
| RS | Rio Grande do Sul |
| RSS | <i>Runting Stunting Syndrome</i> (Síndrome de Refugagem) |
| SC | Santa Catarina |
| s | Segundos |
| SEAPDR | Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural |
| SIF | Serviço de Inspeção Federal |
| sp. | Espécie |
| spp. | Espécies |
| SPSS | <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (Pacote Estatístico para as Ciências Sociais) |
| T-RFLP | <i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo do Tamanho e Composição de Bases de Fragmentos Terminais de Restrição) |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| UPF | Universidade de Passo Fundo |

SUMÁRIO

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 16 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 16 |
| 2.2. | Objetivos específicos..... | 16 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 17 |
| 3.1 | Processo de produção da carne de frango..... | 17 |
| 3.1.1 | Etapas do abate e processamento..... | 17 |
| 3.1.2 | Contaminação da carcaça durante o processamento..... | 18 |
| 3.2 | Microbioma de carcaças de frango de corte..... | 21 |
| 3.3 | Sequenciamento de alto rendimento..... | 22 |
| 3.3.1 | Sequenciamento de segunda geração..... | 24 |
| 3.3.1.1 | Plataforma Illumina..... | 24 |
| 3.3.2 | Sequenciamento de última geração aplicado à avicultura..... | 25 |
| 4 | CONCLUSÃO..... | 29 |
| | REFERÊNCIAS..... | 30 |

1 INTRODUÇÃO

Os avanços em genética, nutrição, manejo e sanidade propiciaram uma excelente evolução do desempenho da avicultura nas últimas décadas e, neste contexto, o Brasil ocupa uma posição de destaque no cenário internacional. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango, sendo que o país produziu quase 13.000.000 toneladas do produto em 2018. Além disto, o país é líder em exportação de carne de frango, tendo exportado 4.101.000 toneladas do produto no último ano (ABPA, 2019). Para manter essa posição consolidada, a agroindústria nacional necessita produzir e exportar alimento seguro e com altos padrões de higiene rígidos. Neste contexto, a preocupação com a sanidade e com a inocuidade dos produtos destinados ao consumidor passa a ser imperativo.

Os produtos de origem avícola estão relacionados com os principais patógenos de importância em saúde pública, como *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Desta forma, o controle microbiológico destes produtos tornou-se de suma importância para a indústria avícola, tendo em vista que a identificação e a associação de patógenos relacionados com surtos de infecções e toxinfecções alimentares ficou mais evidente ao longo dos últimos anos.

A qualidade higiênico-sanitária dos produtos destinados ao consumidor é de fundamental importância na indústria avícola. Durante o processamento da carcaça no matadouro-frigorífico, diferentes microrganismos podem contaminar o produto, bem como serem transmitidos para o homem. A microbiota nas carcaças é oriunda da ave viva, mas também pode ser modificada ao longo das etapas de processamento através da adição de uma microbiota contaminante.

Os microrganismos representam a maior diversidade de material genético do planeta. Devido às dificuldades de técnicas adequadas de isolamento, estima-se que apenas 0,1% a 1% dos microrganismos possam ser isolados através das técnicas convencionais de cultura (AMANN *et al.*, 1995). Logo, cada vez mais se tem utilizado as ferramentas moleculares para auxiliar na identificação dos microrganismos presentes em um determinado microbioma.

Técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), como polimorfismo do tamanho e composição de bases de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP), eletroforese em gel de gradiente desnaturante/de temperatura (DGGE/TGGE) e técnicas de hibridização, como hibridização fluorescente *in situ*

(FISH) e microarranjo distinguem de forma tradicional as comunidades de microrganismos por meio do padrão de bandas do gene ribossomal. Contudo, atualmente as técnicas de sequenciamento estão sendo amplamente utilizadas para avaliar a diversidade microbiana. Os sequenciadores de primeira, segunda, terceira e quarta geração possibilitam o sequenciamento em larga escala de amostras ambientais para a identificação e para a caracterização das espécies microbianas presentes nas comunidades.

Dentre estes, especialmente as técnicas de sequenciamento de segunda, terceira e de quarta geração, ou sequenciamento de próxima geração de alto rendimento (HT-NGS), estão sendo amplamente utilizadas para determinar os microrganismos presentes em uma amostra, assim como para caracterização de suas funções no respectivo ambiente. Por esta razão, a utilização do HT-NGS representa uma importante ferramenta para análise da diversidade taxonômica da comunidade microbiana total de um ambiente. A técnica também possibilita identificar microrganismos que ainda não foram isolados através do emprego de meios de cultura tradicionais.

Ao contrário do que se observa em áreas específicas de estudo da biologia, como por exemplo, a caracterização dos microrganismos em amostras de solo, as informações sobre a diversidade microbiológica na carcaça de frango e na agroindústria ainda são escassas. Desta forma, este estudo visa identificar as bactérias presentes no microbioma da carcaça de frango e avaliar possíveis variações, isto é, se as bactérias presentes neste microbioma são reduzidas ou eliminadas durante as etapas do processamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar o microbioma presente nas carcaças de frango de corte durante o processo de abate em matadouros-frigoríficos de aves através da técnica de HT-NGS.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os microrganismos presentes em carcaças de frangos de corte na entrada da área limpa e após a embalagem em matadouros-frigoríficos de aves e avaliar variações da composição e da concentração do microbioma.
- Identificar a composição da microbiota presente na água do *chiller*.
- Identificar microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes que possam estar presentes no microbioma das carcaças de frango de corte.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Processo de produção da carne de frango

Durante o processo de produção da carne de frango, ocorre uma grande manipulação das carcaças desde a chegada ao matadouro-frigorífico até o produto final, o que pode levar a alterações da microbiota (SANTOS, 2009). A principal fonte de contaminação durante o abate é a própria ave, através dos microrganismos presentes na superfície do frango, no conteúdo do trato gastrointestinal e nas vias respiratórias (COTTA e DELPECH, 2000). De acordo com Oliveira *et al.* (2011), a microbiota presente nas carcaças pode reduzir a durabilidade do produto, além de representar um risco para a saúde do consumidor. Com o objetivo de reduzir ou minimizar a contaminação das carcaças, o abate das aves deve seguir normas rígidas que visam à produção de alimentos seguros (SILVA *et al.*, 2007). O Serviço de Inspeção Federal (SIF) é responsável pela fiscalização da maior parte da carne de frango produzida no país, garantindo o cumprimento destas normas e assegurando a qualidade desta proteína animal (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

3.1.1 Etapas do abate e processamento

O abate de aves segue normas rígidas descritas no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1950) e no Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves - Portaria 210/98 (BRASIL, 1998), elaborados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estas normas definem as etapas do pré-abate e do abate propriamente dito. Com o objetivo de reduzir a contaminação das carcaças, a estrutura dos matadouros-frigoríficos é dividida em “área suja” e “área limpa”. Na área suja ocorre o recebimento, descarga e pendura das aves, seguida pela insensibilização, sangria, escaldagem e depenagem. Essa área é separada fisicamente da área limpa, onde as carcaças são encaminhadas para a evisceração e a lavagem (BRASIL, 1998).

3.1.2 Contaminação da carcaça durante o processamento

O *status* microbiológico da carcaça depende da eficácia de boas práticas de fabricação do matadouro-frigorífico, que por sua vez depende do fluxograma, dos equipamentos e da higiene dos colaboradores (PATTERSON, 1971). A contaminação da carcaça durante o seu processamento pode ocorrer devido à grande quantidade de matéria orgânica presente nas plantas de abate. Esta contaminação é ocasionada pelo contato com superfícies contaminadas ou através do contato direto com outras carcaças (THOMAS e McMEEKIN, 1980; WHYTE, 2004). Durante o abate, a contaminação pode ser minimizada se os procedimentos de higiene e desinfecção dos equipamentos e das instalações forem rigorosamente adotados (BERNDTSON, DANIELSSON-THAM e ENGVALL, 1996).

A contaminação da carcaça durante o abate inicia-se através da pele da ave. As aves podem trazer junto às penas uma microbiota própria, que pode ser disseminada durante o processamento da carcaça (HUMPHREY e JORGENSEN, 2006). Muitos microrganismos considerados deteriorantes estão presentes na pele das aves: *Acinetobacter*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacter* spp., *Lactobacillus* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp. e *Shewanella putrefaciens*. Outros microrganismos como *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* beta-hemolíticos, *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp., têm sido isolados de frangos de corte (FREITAS *et al.*, 2004). *C. jejuni* também pode estar presente na pele das aves e pode contaminar as superfícies do abatedouro (FORSYTHE, 2002).

Durante o processo de abate, as etapas de escaldagem e de depenagem são as que apresentam os índices mais altos de contaminação. Não obstante, esses índices não são alterados após a etapa de evisceração. A água utilizada na etapa da escaldagem para a “lavagem” da carcaça pode estar relacionada com o aumento da contaminação, indicando uma provável contaminação cruzada (ABU-RUWAIDA, 1994). A utilização do grande volume de água pela indústria avícola durante as etapas do abate pode influenciar para difundir, manter e, até mesmo, para multiplicar as bactérias (PACHECO, 2014).

A maioria dos microrganismos identificados não são considerados patogênicos para os consumidores. A presença de tais microrganismos serve para indicar a qualidade microbiológica e a sanidade do produto que será destinado ao consumo humano. Contudo, a contaminação pode estar relacionada com a presença de patógenos com

potencial deteriorante para o alimento. Tal situação sugere condições sanitárias ineficazes de manipulação, processamento, produção ou armazenamento (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Alguns pontos do fluxograma de abate apresentam um maior risco de contaminação das carcaças. A evisceração, por exemplo, consiste em uma etapa crítica do abate, devido à possibilidade de contaminação cruzada quando ocorre perfuração do intestino (COTTA e DELPECH, 2000), pois o conteúdo fecal pode entrar em contato com a carcaça. A contaminação da carcaça também pode estar relacionada com a água, o ar, os manipuladores, as facas de corte, as tábuas de corte e o gelo utilizado pela indústria (COTTA e DELPECH, 2000). Outras etapas do processamento também são consideradas críticas para a contaminação, como a pendura, a sangria e a passagem da carcaça pelo *pré-chiller* e pelo *chiller* (ALMEIDA e SILVA, 1992).

A etapa do *pré-chiller* é considerada contestável por alguns pesquisadores no que concerne sobre a composição ou controle da microbiota das carcaças de frango que passam por este sistema. O *pré-chiller* pode tanto diminuir a multiplicação de microrganismos deteriorantes e inibir o desenvolvimento de bactérias com potencial patogênico, quanto pode participar na contaminação cruzada das carcaças de frangos. O uso de temperatura baixa, bem como da água clorada são de suma importância nesta etapa do processamento (ABU-RUWAIDA, 1994; VON RÜCKERT *et al.*, 2009).

A presença de microrganismos aeróbios mesófilos e de bactérias do grupo coliforme em altos níveis em alimentos processados indica tratamento inadequado e/ou contaminação pós-processamento. Esta contaminação está relacionada com a falta de higiene durante a manipulação e/ou contato da carcaça com equipamentos não higienizados corretamente (RODRIGUES *et al.*, 2008).

A vida de prateleira dos produtos está diretamente relacionada com a contaminação inicial e final da carcaça, uma vez que a diminuição da microbiota final depende das diversas etapas do abate (KNOOP, PARMELLE e STADELMAN, 1971). Alimentos com microbiota deteriorante ou patogênica propiciam baixa rentabilidade, devido à vida curta de prateleira, além de representarem riscos à saúde humana (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Um abate com um bom controle de qualidade propiciará uma carcaça com menor contaminação e, conseqüentemente, um maior tempo de vida de prateleira (ISOLAN, 2007). Monitorias devem ser feitas constantemente para identificar os pontos de maior contaminação e os microrganismos que estão circulando na planta de abate (ABU-RUWAIDA *et al.*, 1994).

Segundo Mead (1974), o controle microbiológico durante o abate determina a qualidade final do produto. Os índices microbiológicos são empregados principalmente na análise final da carcaça e/ou cortes de aves, porém são indicados também para avaliar o processo de abate (AVENS *et al.*, 2002; CARVALHO, COSTA e CARVALHO, 2002; CARDOSO *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2008).

De acordo com Rodrigues *et al.* (2008), os chuveiros de lavagem das carcaças, instalados entre a entrada da área limpa até após a evisceração, não exercem efeito significativo na redução de aeróbios mesófilos, coliformes totais e coliformes termotolerantes.

O MAPA instituiu alguns programas de controle no que tange sobre a qualidade dos produtos de origem animal. Um destes programas é a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (BRASIL, 1998), que foi inserido gradualmente nas indústrias de produtos de origem animal, sob o regime do SIF. Já o Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP) (BRASIL, 2017) tem por objetivo realizar a análise laboratorial contínua das carcaças de frangos de corte e perus, *in natura*, para a identificação de *Salmonella* spp., envolvendo os matadouros-frigoríficos de aves registrados no SIF (PACHECO, 2014). Concomitante aos programas já mencionados acima, o SIF coordena e realiza rigorosamente a inspeção sanitária do abate nos matadouros-frigoríficos de frangos de corte pela medição e pelos registros dos parâmetros de controle higiênico sanitário dispostos na Portaria N° 210 (BRASIL, 1998).

Atualmente, o maior entrave é diminuir a disseminação dos microrganismos, evitando assim uma contaminação entre as carcaças. Além dos programas de APPCC, o matadouro-frigorífico deve ter um programa de limpeza e sanitização eficiente, um controle periódico da qualidade da água e dos microrganismos circulantes no ambiente industrial, além de controles de higiene dos manipuladores (BARBALHO *et al.*, 2005). Alternativamente, a indústria pode adotar técnicas mais robustas, como as técnicas de HT-NGS, para poder identificar novos microrganismos circulantes na sua planta, ou simplesmente para avaliar a diversidade microbiana, tendo em vista que apenas 0,1-1% dos microrganismos é cultivável através das técnicas convencionais de isolamento (DIMITROV, 2009).

3.2 Microbioma de carcaças de frango

A deterioração do produto, bem como infecções e toxinfecções alimentares estão diretamente relacionadas com a presença dos microrganismos na carne (GALHARDO, 2006). Os microrganismos encontram na carne um excelente “meio de cultivo”, devido as suas características peculiares, como grande atividade de água, alto valor nutricional e o pH tendendo a valores neutros (SOUZA *et al.*, 2014).

A composição da microbiota das carcaças de frangos pode ser afetada pelas diferentes etapas do abate. Microrganismos aeróbios mesófilos, enterobactérias, *Bacillus* sp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* sp. e *Streptococcus* spp. são comumente encontrados nas carcaças e servem como indicadores da qualidade higiênica dos produtos (CARDOSO *et al.*, 2005). Em matadouros-frigoríficos de aves, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* são os microrganismos patogênicos mais comumente encontrados (FORSYTHE, 2002).

Neste sentido, vários são os estudos que empregam a metodologia convencional com o uso de meios de cultura específicos para a identificação destes microrganismos patogênicos. Araújo *et al.* (2002), ao analisar dez amostras de *blanquet* de peru fatiado e dez amostras de presunto de peru fatiado, detectaram *Listeria monocytogenes* em 50% e 60% das amostras, respectivamente. Silva *et al.* (2002) isolaram *Salmonella* spp. em 71,7%, *Escherichia coli* em 95% e *Staphylococcus aureus* em 43,3% de 60 cortes de carne de aves adquiridos no comércio varejista da cidade de João Pessoa, PB.

Já em São Paulo, Tessari *et al.* (2008) mostraram a presença de *Salmonella* Enteritidis em 19,1% das 68 amostras de carcaças de frangos congeladas e processadas oriundas de matadouros-frigoríficos que foram analisadas. Rodrigues *et al.* (2008) analisaram a contaminação superficial de carcaças de frango por microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes totais e coliformes termotolerantes em diferentes fases do processo de abate em um matadouro-frigorífico sob sistema SIF. De acordo com os resultados, não houve diferença estatística significativa entre as diferentes fases de abate. Perdoncini *et al.* (2015) avaliaram a ocorrência de *C. jejuni* e *C. coli* em 105 carcaças de frangos de corte coletadas após o *chiller* em matadouros-frigoríficos localizados no sul do Brasil. Do total analisado, em 37,1% das carcaças foi isolada o *Campylobacter*, sendo que *C. jejuni* e *C. coli* foram identificados, respectivamente, em 97,5% e em 2,5% dos casos.

A contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis é o método indicador de populações bacterianas em alimentos que é mais utilizado (BRASIL, 2017). Entretanto, sabe-se que a maioria dos microrganismos não é cultivável pelas técnicas convencionais de isolamento ou podem não ser detectados quando em níveis muito baixos (DIMITROV, 2009). Assim, técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), também estão sendo utilizadas para identificar patógenos nas carcaças. Hong *et al.* (2003) padronizaram uma PCR-ELISA para identificação de *C. jejuni* e *Salmonella enterica* a partir de carcaças de frangos. Cortez *et al.* (2006) relataram a ocorrência de *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em matadouros-frigoríficos por multiplex-PCR a partir de amostras de fezes, de penas, da escaldagem, da evisceração e de rinsagem de carcaças não evisceradas, evisceradas e do *chiller*. Matias *et al.* (2010) compararam os níveis de *Salmonella* spp. detectados por PCR diretamente de carcaças e de caldos de pré-enriquecimento, antes e depois da incubação, para verificar a viabilidade da técnica a ser utilizada em programas de controle de qualidade. Ivanova *et al.* (2014) desenvolveram uma PCR em tempo real para identificação rápida de *C. jejuni* para aplicação em diferentes etapas do processamento de aves. Lindsey *et al.* (2015) desenvolveram uma multiplex PCR para determinar se *Escherichia albertii* estava presente em amostras de carcaças durante o processamento.

Técnicas de HT-NGS também já foram utilizadas em alguns estudos recentes citados na literatura. Nieminem *et al.* (2012) compararam a composição, a diversidade e o potencial metabólico das comunidades microbianas em produtos marinados e não marinados. Zhang *et al.* (2014) reportaram sequências virais de girovírus detectadas em carne de frango. Kim *et al.* (2017) identificaram alterações microbianas na composição de carcaças de frango durante o processamento, além de terem comparado as comunidades microbianas identificadas através do HT-NGS e do isolamento convencional em carcaças de frango rinsadas com água peptonada. Entretanto, ainda não existem dados disponíveis quanto à composição do microbioma de carcaças de frango produzidas no Brasil.

3.3 Sequenciamento de alto rendimento

Estudos sobre a diversidade microbiana têm avançado consideravelmente desde que os métodos de sequenciamento de DNA foram desenvolvidos por Sanger, Nicklens

e Coulson (1977). Esse avanço se deve a estudos filogenéticos moleculares que visam tentar relacionar os microrganismos. Árvores filogenéticas baseadas em sequências de genes são mapas ilustrativos da biodiversidade (HUGENHOLTZ, GOEBEL e PACE, 1998). Entretanto, o conhecimento da extensão e da diversidade microbiana tem sido limitado pelo estudo de microrganismos cultivados. Estima-se que 99% dos microrganismos na natureza não são cultivados pelas técnicas convencionais (AMANN, LUDWIG e SCHLEIFER, 1995).

Entre 1977 e 2016, quatro gerações de sequenciamento foram desenvolvidas e são denominadas de sequenciamento de alto rendimento (*high throughput sequencing* – HTS) ou sequenciamento de última geração (*next generation sequencing* – NGS) (AMBARDAR *et al.*, 2016). Essas novas tecnologias permitem um sequenciamento com maior geração de dados a um menor custo (AMBARDAR *et al.*, 2016). As plataformas de segunda geração são GS FLX 454 (Roche[®], Branford, EUA), HiSeq, MiSeq, NextSeq e Solexa (Illumina[®], San Diego, EUA), SOLiD ABI e Ion Torrent (ThermoFischer *Scientific*[®], Gilford, EUA), e as plataformas de terceira e de quarta geração são PacBio (Pacific Biosciences[®], Menlo Park, EUA) e Nanopore (Oxford Nanopore *Technologies*[®], Oxford, Reino Unido) (AMBARDAR *et al.*, 2016).

O sequenciamento de alto rendimento propicia resultados rápidos e, com isso, proporciona novas abordagens na microbiologia. Diversos microrganismos que não são cultiváveis até o momento podem ser caracterizados com essas novas tecnologias. Assim, o gene 16S rRNA é o mais utilizado atualmente para identificar bactérias devido a sua alta conservação e ao volume de sequências disponíveis em bancos de dados (HUGENHOLTZ, SKARSHEWSKI e PARKS, 2016; YANG *et al.*, 2016). O sequenciamento a partir do gene 16S rRNA propicia uma extensa gama de identificação de diversas bactérias diretamente de amostras ambientais, eliminando a etapa de técnicas convencionais de cultivo de microrganismos (CHRISTOFF *et al.*, 2017). O 16S rRNA possui nove regiões hipervariáveis, V1-V9, que são largamente utilizadas para estudos sobre a taxonomia de microrganismos (YANG *et al.*, 2016). A acurácia na identificação da região 16S do rRNA é dependente de diversas etapas do sequenciamento, como a preparação da biblioteca, o sequenciamento propriamente dito e a análise de bioinformática (TREMBLAY *et al.*, 2015; KEBSCHULL e ZADOR, 2015; GOHL *et al.*, 2016).

3.3.1 Sequenciamento de segunda geração

As plataformas de segunda geração diferem, principalmente, na química do sequenciamento, o que proporciona diferenças nas taxas de desempenho, comprimento da leitura, taxa de erro, cobertura do genoma, custo e tempo de execução (METZKER, 2010; SCHOLZ, LO e CHAIN, 2012). Para o sequenciamento, são necessárias duas etapas: a preparação do *template* e o sequenciamento propriamente dito. A preparação do *template* é dividida em três partes: (i) extração do ácido nucleico, que depende da amostra, fonte e tipo de estudo a ser feito (METZKER, 2010; FIERER *et al.*, 2012); (ii) preparação das bibliotecas, que envolve a fragmentação do DNA em menor tamanho de forma aleatória, a sobreposição de fragmentos seguida da purificação final do DNA fragmentado e da ligação de um adaptador (CARUCCIO, 2011; HINGAMP *et al.*, 2013); (iii) amplificação do *template*, na qual o DNA *template* selecionado após a montagem da biblioteca está sujeito à amplificação clonal. A amplificação clonal envolve a amplificação em fase sólida de fragmentos de DNA e ajuda no desenvolvimento de sinal fortemente detectável durante o sequenciamento. O único fragmento de DNA a ser sequenciado é aquele fragmento que se ligar às *beads*, superfícies iônicas ou células de fluxo. Dependendo da plataforma de sequenciamento, a PCR em emulsão (emPCR) ou PCR em ponte é utilizada para amplificar os fragmentos de DNA ancorados em milhões de fragmentos de matriz espacialmente separados (SHAO *et al.*, 2011; KAWASHIMA, LAURENT e PASCAL, 2012).

3.3.1.1 Plataforma Illumina

A plataforma Illumina necessita da montagem de uma biblioteca de sequenciamento, a qual permite a amplificação e a fixação das sequências que serão submetidas ao sequenciamento. São necessários dois adaptadores diferentes que são adicionados nas terminações 5' e 3' de todas as moléculas. Este sequenciamento utiliza o método do molde amplificado clonalmente (METZKER, 2010).

Somente as plataformas Illumina realizam o sequenciamento denominado *paired-end*, através do qual a amplificação clonal é feita via pontes de PCR (Figura 1) (KAWASHIMA *et al.*, 2012). O método *paired-end* permite sequenciar os fragmentos de DNA a partir de ambas extremidades, resultando em uma plataforma com alta cobertura, alto número de leituras e maior volume de dados, quando comparado com

sistema de sequenciamento de fim único (AMBARDAR *et al.*, 2016). Este tipo de sequenciamento gera dados de sequência de alta qualidade, devido a maior probabilidade de alinhamento a uma referência, além de facilitar a detecção de rearranjos genômicos (inserções, deleções e inversões), elementos de sequências repetitivas, fusões de genes e novos transcritos (AMBARDAR *et al.*, 2016). Além disso, também fornece alinhamento superior através de regiões do DNA contendo sequências repetitivas e produz grandes *contigs* para *de novo* sequenciamento por preenchimento de lacunas na sequencia consenso (AMBARDAR *et al.*, 2016).

O MiSeq permite fazer resequenciamento direcionado, análise metagenômica 16S, sequenciamento de genomas pequenos, perfis de expressão gênica direcionados, entre outras funções. Os reagentes do MiSeq permitem até 15Gb de saída de dados com 25 milhões de leituras de sequenciamento e comprimentos de leitura de 2×300 pb (Illumina®).

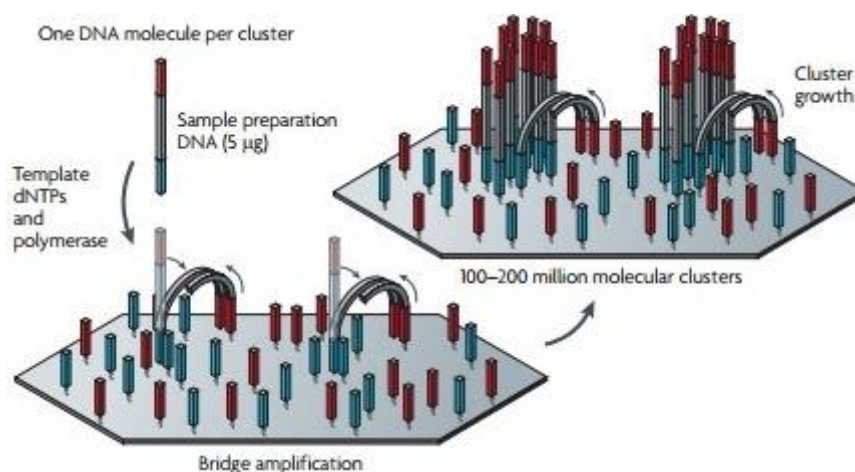


Figura 1. Processo de sequenciamento plataforma Illumina, onde o DNA se liga adaptadores em ambas às extremidades (*paired-end*) e durante a amplificação forma as “pontes” (modificado de METZKER, 2010).

3.3.2 Sequenciamento de última geração aplicado à avicultura

Técnicas moleculares avançadas, tais como o HT-NGS, vêm sendo amplamente utilizadas na produção avícola. Entretanto, o uso destas técnicas está mais relacionado a estudos da microbiota intestinal ou respiratória (SHAUFI *et al.*, 2015; SHABBIR *et al.*, 2015). Kim e Mundt (2011) compararam a microbiota intestinal de frangos saudáveis e acometidos com a síndrome da desuniformidade tardia (*Runting Stunting Syndrome* -

RSS). Yeoman *et al.* (2012) unificaram as informações sobre microbioma e biologia molecular a respeito do trato gastrointestinal de frangos. Zhao *et al.* (2013) analisaram a microbiota intestinal relacionando gênero e genótipo. Sergeant *et al.* (2014) analisaram o perfil microbiano cecal de frangos de corte e encontraram 699 filotipos, sendo a maioria desconhecida. Já Waite e Taylor (2014) também estudaram a microbiota intestinal de aves e demonstraram que as aves possuem uma composição similar àquela dos mamíferos.

Videnska *et al.* (2014) analisaram a prevalência de genes de resistência a antimicrobianos, bem como a microbiota intestinal de aves de postura e de corte de quatro diferentes países da Europa Central determinados por PCR em tempo real e por pirosequenciamento. Shaufi *et al.* (2015) analisaram a microbiota do íleo e do ceco de aves mais velhas e encontraram maior diversidade na microbiota no ceco em relação às aves mais jovens. Choi, Lee e Sul (2015) elaboraram uma revisão sobre estratégias de HT-NGS recentes para analisar a composição da microbiota do trato gastrointestinal de aves e suas funções relacionadas à saúde. Ballou *et al.* (2016) analisaram a ontogenia da microbiota intestinal de frangos e como os tratamentos bacterianos vivos utilizados comumente influenciam a dinâmica desta comunidade microbiana. Shah *et al.* (2016) caracterizaram o desenvolvimento da comunidade viral de RNA no intestino delgado de frangos de corte saudáveis desde a eclosão até 6 semanas de idade e a contribuição da origem do criador *versus* idade da ave no desenvolvimento da estrutura da comunidade. Shabbir *et al.* (2015) caracterizaram a microbiota do trato respiratório inferior de 14 aves no Paquistão.

Shehata *et al.* (2015) caracterizaram e sequenciaram o genoma total do vírus H9N2 isolados de surtos em frangos de corte no Egito. O'Brien *et al.* (2016) caracterizaram a composição de comunidades microbianas de poeiras sedimentada e em suspensão em instalações de frangos de corte por HT-NGS. Salahenn *et al.* (2017) determinaram a composição de extratos fenólicos bioativos de mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) e amora-preta (*Rubus fruticosus*) e avaliaram sua funcionalidade como uma intervenção alternativa aos promotores de crescimento em frangos de corte por modulação da microbiota do intestino. Eckstrom e Barlow (2019) identificaram e caracterizaram genes de resistência a antibióticos em resíduos alimentares, adubos e produtos agrícolas, assim como avaliaram a presença de comunidades microbianas e espécies potencialmente patogênicas através do HT-NGS. Qi *et al.* (2019) analisaram a estrutura e a diversidade da microbiota cecal de frangos de corte e aves de postura.

Neste estudo, a análise por sequenciamento demonstrou que *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* foram os principais filos bacterianos cecais identificados em ambas categorias de aves.

Kim *et al.* (2019) avaliaram o método de isolamento de *C. jejuni* a partir de fezes de frango usando HT-NGS e técnicas de isolamento convencional. A técnica de HT-NGS foi utilizada para indicar qual o melhor meio para isolar *C. jejuni* a partir das fezes de frangos. De Césare *et al.* (2019) investigaram o impacto da suplementação de uma dieta pobre em proteínas no microbioma cecal e no desempenho produtivo de frangos de corte. O estudo mostrou que uma ingestão reduzida de proteína bruta em frangos de corte aumenta a quantidade de *Lactobacillaceae* no ceco.

Qiu *et al.* (2019) utilizaram o HT-NGS para estudar os principais vírus que infectavam seis granjas de aves em duas províncias do leste da China. Lee *et al.* (2019) caracterizaram a comunidade microbiana no trato reprodutivo de aves de postura e determinaram a origem da microbiota intestinal do embrião. A microbiota do oviduto foi analisada em quatro diferentes regiões através do HT-NGS. A composição microbiana e abundância relativa de gêneros bacterianos foram estáveis em todo o trato reprodutivo da ave, sendo que o oviduto da galinha mostrou uma abundância relativamente alta de *Lactobacillus*.

Em relação à segurança dos alimentos e aos estudos do microbioma em aves, existem poucos trabalhos desenvolvidos até o momento. Nieminem *et al.* (2012) utilizaram a técnica de HT-NGS para comparar a composição, a diversidade e o potencial metabólico das comunidades microbianas de filetes de carne marinados e não marinados. Já Zhang *et al.* (2014) reportaram sequências virais via HT-NGS detectadas em carne bovina, suína e de frango que foram adquiridos em supermercados da cidade de San Francisco nos Estados Unidos. Rothrock *et al.* (2016) avaliaram os microbiomas presentes no *chiller* em um matadouro-frigorífico de aves e determinaram como as populações de bactérias, incluindo patógenos de origem alimentar e organismos de decomposição, variam em relação às comunidades bacterianas em geral de acordo com o dia de processamento. Handley *et al.* (2018) utilizaram HT-NGS e dados quantitativos de isolamento convencional para determinar o perfil da microbiota de carcaças de frango e a eficácia de antimicrobianos. Recentemente, Chen *et al.* (2020) analisaram a diversidade da comunidade bacteriana em carcaças de frango em várias etapas em uma linha de processamento na Austrália. Dez carcaças de frango foram amostradas aleatoriamente antes e depois da escaldagem, antes e depois do resfriamento

no *chiller* e após o resfriamento a ar. O estudo tentou identificar onde a contaminação cruzada pode ocorrer e qual etapa do processamento teve a influência mais significativa no perfil da comunidade bacteriana nas carcaças de frango

4 CONCLUSÃO

- Foram identificadas 21 Espécies bacterianas na entrada da área limpa e ou após a embalagem final nos três matadouros-frigoríficos. No geral, o processo de abate reduziu o número de espécies e a quantidade de sequências identificadas dos microrganismos.
- Foram identificadas 17 Espécies bacterianas nos pontos de coleta do *chiller* nos três matadouros-frigoríficos, sendo que o tanque de resfriamento não foi capaz de eliminar ou diminuir o *Sphingomonas paucimobilis*, nos matadouros-frigoríficos A e B, e de *Acinetobacter bohemicus* e *Arcobacter cryaerophilus* no matadouro-frigorífico C.
- Entre os microrganismos com potencial patogênico detectado, foi observada a presença do *C. jejuni* nos três matadouros-frigoríficos. O processo de abate foi capaz em eliminar este microrganismo em todos os estabelecimentos.
- O microbioma das carcaças de frango de corte não pode ser atribuído com um único perfil para todos os matadouros-frigoríficos, pois cada um desses lotes analisados é oriundo de diferentes propriedades. Dessa forma não é possível atribuir características específicas aos microbiomas como um todo, pois cada matadouro-frigorífico apresenta sua própria microbiota relacionado à origem do lote.

REFERÊNCIAS

- ABPA, **Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual ABPA, 2017.** Disponível em: < http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzi do.pdf> Acesso em : Janeiro de 2020.
- ABU-RUWAIDA, A.S. *et al.* Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. **Journal of Food Protection**, v.57, n.10, p.887-892, 1994.
- ALMEIDA, P.F. de; SILVA, E.N. da. Estudos sobre o controle e disseminação bacteriana em carcaças de frangos de abatedouros industriais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, n.2, p. 105-120, 1992.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, n.59, p143-169, 1995.
- AMBARDAR, S.; GUPTA, R.; TRAKROO, D.; LAL, R.; VAKHLU, J. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n.4, p.394-404, 2016.
- ARAÚJO, P.C.C.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; CARVALHO, J.C.A.P. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ-Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, n.1, p.19-25, 2002.
- AVENS, J.S.; ALBRIGHT, S.N.; MORTON, A.S.; PREWITT, B.E.; KENDALL, P.A.; SOFOS, J.N. Destruction of microorganisms on chicken carcasses by steam and boiling water immersion. **Food Control**, v.13, p. 445-450, 2002.
- BALLOU, A.L.; ALI, R.A.; MENDOZA, M.A.; ELLIS, J.C.; HASSAN, H.M.; CROOM, W.J.; KOCI, M.D. Development of the chick microbiome: how early exposure influences future microbial diversity. **Frontiers in Veterinary Science**, v.3, n.2, 2016.
- BARBALHO, T.C.F.; ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, v.16, p. 211-216, 2005.
- BERNDTSON, E.; DANIELSSON-THAM, M.L.; ENGVALL, A. *Campylobacter* incidence on a farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. **Food Microbiology**, v.32, p. 35-47, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto N° 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, 1950. Disponível em: < <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1950-1959/decreto-30691-29-marco-1952-339586-norma-actualizada-pe.pdf>> Acesso em janeiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 26 nov. 1998. Seção 1, p. 226. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=3162>> Acesso em janeiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Patógenos 2017. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animais/controlado-de-patogenos>> Acesso em janeiro de 2020.

CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M.; TESSARI, E.N.C.; BASLDASSI, L.; PINHEIRO, E.S. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v.19, n. 128, p. 144-150, 2005.

CARUCCIO, N. Preparation of next-generation sequencing libraries using Nextera™ technology: simultaneous DNA fragmentation and adaptor tagging by in vitro transposition. **Methods in Molecular Biology**, v.733, p. 241-255, 2011.

CARVALHO, L.T.; COSTA, P.S.; CARVALHO, A.L.T. Análise de perigos e pontos críticos de controle na linha de produção de frango inteiro congelado. **Higiene Alimentar**, v.16, n. 95, p. 34-42, 2002.

CHEN, S.H.; FEGAN, N.; KOCHARUNCHITT, C.; BOWMAN, J.P.; DUFFY, L.L. Changes of the bacterial community diversity on chicken carcasses through an Australian poultry processing line. **Food Microbiology**, 86, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103350> . 2020.

CHOI, K.Y.; LEE, T.K.; SUL, W.J. Metagenomic analysis of chicken gut microbiota for improving metabolism and health of chicken – a review. **Asian-Australasian of Journal Animal Science**, v.28, n.9, p.1217-1225, 2015.

CHRISTOFF, A.P.; SEREIA, A.F.R.; BOBERG, D.R.; MORAES, R.L.V.; OLIVEIRA, L.F.V. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **Neoprosecta Microbiome Technologies**. 2017, 5 p. Disponível em: < <https://neoprosecta.com/>> Acesso em: Janeiro de 2020.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; IKUNO, A.A.; B6URGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.3, p.340-344, 2006.

COTTA, T.; DELPECH, P. Características sensoriais da carne de frango segundo o grau de contaminação bacteriana das carcaças. **A Hora Veterinária**, ano 20, n.115, p.44-47, 2000.

DE CÉSARE, A.; VALLE, I. F.; SALA, C.; SIRRI, F.; ASTOLFI, A.; CASTELLANI, G.; MANFREDA, G. Effect of a low protein diet on chicken ceca microbiome and

productive performances. **Poultry Science**, 98:3963–3976
<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez132> . 2019.

DIMITROV, M.R. **Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxicarboxilatos**. 100 f. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ECKSTROM, K.; BARLOW, J.W. Resistome metagenomics from plate to farm: The resistome and microbial composition during food waste feeding and composting on a Vermont poultry farm. **PLoS ONE** 14(11): e0219807.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219807> .2019.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 424 p., 2002.

FIERER, N.; LAUBER, C.L.; RAMIREZ, K.S.; ZANEVELD, J.; BRADFORD, M.A.; KNIGHT, R. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. **The ISME Journal**, v.6, n.5, p. 1007-1017, 2012.

FREITAS, M.F.L.; LEÃO, A.E.D.S.; STAMFORD, T.L.M.; MOTA, R.A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. **B.CEPPA**. Curitiba, v.22, p.227, 2004.

GALHARDO, J.A.; LOPES, M; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R; SANCHES, S.F.; FREITAS, J.C; MÜLLER, E.E. Eficácia dos tanques de pré-resfriamento na redução de contaminação bacteriana em carcaças de frango. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.4, p.647-656, 2006.

GOHL, D.; VANGAY, P.; GARBE, J.; MACLEAN, A.; HAUGE, A.; BECKER, A.; GOULD, T.; CLAYTON, J.; JOHNSON, T.; HUNTER, R.; KNIGHTS, D.; BECKMAN, K. Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies. **Nature Biotechnology**, v.34, n.9, p.942-949, 2016.

HANDLEY, J.A.; PRK, S.H.; KIM, S.A.; RICKE, S.C. Microbiome Profiles of Commercial Broilers Through Evisceration and Immersion Chilling During Poultry Slaughter and the Identification of Potential Indicator Microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, 9:345. doi: 10.3389/fmicb.2018.00345, 2018.

HINGAMP, P.; GRIMSLEY, N.; ACINAS, S.G.; CLERISSI, C.; SUBIRANA, L.; POULAIN, J.; FERRERA, I.; SARMENTO, H.; VILLAR, E.; LIMA-MENDEZ, G.; FAUST, K.; SUNAGAWA, S.; CLAVERIE, J.M.; MOREAU, H.; DESDEVISES, Y.; BORK, P.; RAES, J.; de VARGAS, C.; KARSENTI, E.; KANDELS-LEWIS, S.; JAILLON, O.; NOT, F.; PESANT, S.; WINCKER, P.; OGATA, H. Exploring nucleocytoplasmic large DNA viruses in Tara Oceans microbial metagenomes. **The ISME Journal**, v.7, n.9, p.1678-1695, 2013.

HONG, Y.; BERRANG, M.E.; LIU, T.; HOFACRE, C.L.; SANCHEZ, S.; WANG, L.; MAURER, J.J. Rapid detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, and *Salmonella enterica* on poultry carcasses by using PCR-Emzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.6, p.3492-3499, 2003.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.18, p.4765-4774, 1998.

HUGENHOLTZ, P.; SKARSHEWSKI, A.; PARKS, D. Genome-Based Microbial Taxonomy Coming of Age. **Cold Spring Harbor Perspective in Biology**, v.8, n.6, a018085, 2016.

HUMPHREY, T.; JORGENSEN, F. Pathogens on meat and infection in animals – Establishing a relationship using *Campylobacter* and *Salmonella* as examples. **Meat Services**, v.74, n.1, p.89-97, 2006.

ISOLAN, L.W. **Estudo da eficiência da etapa de pré-resfriamento por imersão em água no controle da qualidade microbiológica das carcaças de frango**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

IVANOVA, M.; SINGH, R.; DHARMASENA, M.; GONG, C.; KRASTANOV, A.; JIANG, X. Rapid identification of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses and slaughtering environment samples by real-time PCR. **Poultry Science**, v.93, n.6, p.1587-1597, 2014.

KAWASHIMA ERIC, H.; LAURENT, F.; PASCAL, M. (2005-05-12). “Patent: Method of nucleic acid amplification”. Retrieved 2012-12-22.

KEBSCHULL, J.; ZADOR, A. Sources of PCR-induced distortions in highthroughput sequencing data sets. **Nucleic Acids Research**, v.43, n.21, e143, p.1-15, 2015.

KIM, J.; GUK, J.H.; MUN, S.H.; NA, J.U.; SONG, H.; KIM, J.; RYU, S.; JEON, B.; CHO, S. Metagenomic analysis of isolation methods of a targeted microbe, *Campylobacter jejuni*, from chicken feces with high microbial contamination. **Microbiome**, 7: 67, doi: 10.1186/s40168-019-0680-z. 2019.

KIM, S.A.; PARK, S.H.; LEE, S.I., OWENS, C.M.; RICKE, S.C. Assesment of chicken carcass microbiome responses during processing in the presence of commercial antimicrobials using a next generation sequencing approach. **Scientific Reports**, v.23, n.7, p.1-14, 2017.

KIM, T.; MUNDT, E. Metagenomic analysis of intestinal microbiomes in chickens. In: Young Ming Know & Steven C. Ricke (Ed.). **High-Throughput Next Generation Sequencing. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**. Totowa, NJ: Humana Press, v.733, Chapter 13, p.185-194, 2011.

- KNOOP, G.N.; PARMELLE, C.E.; STADELMAN, W.J. Microbiological characteristics of wet and dry chilled poultry. **Poultry Science**, v.50, n. , p.530-536, 1971.
- LEE, S.; LA, T.M.; LEE, H.J.; CHO, I.S.; SONG, C.S.; PARK, S.Y.; LEE, J.B.; LEE, S.W. Characterization of microbial communities in the chicken oviduct and the origin of chicken embryo gut microbiota. **Scientific Reports**, 2;9(1):6838. doi: 10.1038/s41598-019-43280-w. 2019.
- LINDSEY, R.L.; FEDORKA-CRAY, P.J.; ABLEY, M.; TURPIN, J.B.; MELNERSMANN, R.J. Evaluating the Occurrence of *Escherichia albertii* in Chicken Carcass Rinses by PCR, Vitek Analysis, and Sequencing of the rpoB Gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, n.5, p.1727-1734, 2015.
- MATIAS, B.G.; PINTO, P.S.A.; COSSI, M.V.C.; SILVA Jr., A.; VANETTI, M.C.D.; NERO, L.A. Evaluation of a polymerase chain reaction protocol for the detection of *Salmonella* species directly from superficial samples of chicken carcasses and preenrichment broth. **Poultry Science**, v.89, n.7, p.1524-1529, 2010.
- MEAD, G.C. Bacteriological control in the processing of poultry. **Veterinary Record**, v.95, n.25-26, p.569-572, 1974.
- METZKER, M.L. Sequencing technologies: the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v.11, n.1, p.31–46, 2010.
- NIEMINEM, T.T.; KOSKINEN, K.; LAINE, P.; HULTAN, J.; SÄDE, E.; PAULIN, L.; PALORANTA, A.; JOHANSSON, P.; BJÖRKROTH, J.; AUVINEM, P. Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, n.2, p.142-149, 2012.
- O'BRIEN, K.M.; CHIMENTI, M.S.; FARNELL, M.; TABLER, T.; BAIR, T.; BRAY, J.L.; NONNENMANN, M.W. High throughput genomic sequencing of bioaerosols in broiler chicken production facilities. **Microbial Biotechnology**, v.9, n.6, p.782-791, 2016.
- OLIVEIRA, A.A.; ANDRADADE, M.A.; ARMENDARIS, P.M.; BUENO, P.H.S. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. **Ciência Animal Brasileira**, v.17, n.1, p.79-89, 2016.
- OLIVEIRA, A.V.B.; SILVA, R.A.; ARAÚJO, A.S.; BRANDÃO, P.A.; SILVA, F.B. Padrões microbiológicos da carne de frango de corte – Referencial teórico. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.6, n.3, p.01-16, 2011.
- OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. Disponível em: <https://nanoporetech.com/> Acesso em janeiro de 2020.
- PACHECO, D.L. **Qualidade microbiológica da cadeia de carne de aves da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2014. 113 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

PATTERSON, J.T. Microbiological aspects of poultry processing. **British Poultry Science**, v.12, n.2, p.197-203, 1971.

PERDONCINI, G.; SIERRA-ARGUELLO, Y.M.; LIMA, L.M.; TRINDADE, M.M.; GOMES, M.J.P.; SANTOS, L.R.; SCHMIDT, V.; NASCIMENTO, V.P. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* on broiler carcasses after chilling in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35(4):349-352, doi: 10.1590/S0100-736X2015000400006, 2015.

QI, Z.; SHI, S.; TU, J.; LI, S. Comparative metagenomic sequencing analysis of cecum microbial diversity and function in broilers and layers. **Biotech**, 9(8):316, doi: 10.1007/s13205-019-1834-1, 2019.

Qiu, Y.; Wang, S.; Huang, B.; Zhong, H.; Pan, Z.; Zhuang, Q.; Peng, C.; Hou, G.; Wang, K. Viral infection detection using metagenomics technology in six poultry farms of eastern China. **PLoS ONE**, 14(2): e0211553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211553>, 2019.

RODRIGUES, A.C.A.; PINTO, P.S.A.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; PINTO, M.S.; NERO, L.A. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1948-1953, 2008.

ROTHROCK, M. J.; LOCATELLI, A.; GLENN, T. C.; THOMAS, J. C.; CAUDILL, A. C., KIEPPER, B. H.; HIETT, K. L. Assessing the microbiomes of scald and chiller tank waters throughout a typical commercial poultry processing day. **Poultry Science**, 95:2372–2382, <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew234> . 2016.

SALAHENN, S.; KIM, S.W.; HALEY, B.J.; KESSEL, J.A.S.; BISWAS, D. Alternative growth promoters modulate broiler gut microbiome and enhance body weight gain. **Frontiers in Microbiology**, 8:2088, doi: 10.3389/fmicb.2017.02088, 2017.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, J.S. **Avaliação da qualidade microbiológica de carnes de frango comercializadas na cidade de Aracaju, SE**. 2009. 39 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Gestão da Qualidade e Vigilância Sanitária em Alimentos) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN. 2009.

SCHOLZ, M.B.; LO, C.C.; CHAIN, P.S.G. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, n.1, p.9-15, 2012.

SERGEANT, M.J.; CONSTANTINIDOU, C.; COGAN, T.A.; BEDFORD, M.R.; PENN, C.W.; PALLEN, M.J. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. **PLoS ONE**, v.9, n.3, e91941, 2014.

- SHABBIR, M.Z.; MALYS, T.; IVANOV, Y.V.; PARK, J.; SHABBIR, M.A.B.; RABBANI, M.; YAQUB, T.; HARVILL, E.T. Microbial communities presente in the lower respiratory tract of clinically, healthy birds in Pakistan. **Poultry Science**, v.94, n.4, p.612-620, 2015.
- SHAH, J.D.; DESAI, P.T.; ZHANG, Y.; SCHARBER, S.K.; BALLER, J.; ZHENG, S.X.; CARDONA, C.J. Development of the intestinal RNA vírus community of healthy broiler chickens. **PLoS ONE**, v.11, n.2, e0150094, 2016.
- SHAO, K.; DING, W.; WANG, F.; LI, H.; MA, D.; WANG, H. Emulsion PCR: a High Efficient Way of PCR Amplification of Random DNA Libraries in Aptamer Selection. **PLoS ONE**, v.6, n.9, e24910, 2011.
- SHAUFI, M.A.M; SIEO, C.C.; CHONG, C.W.; GAN, H.M.; HO, Y.W. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. **Gut Pathogens**, 26, 7:4, doi.org/10.1186/s13099-015-0051-7, 2015.
- SHEHATA, A.A.; PARVIN, R.; SULTAN, H.; HALAMI, M.Y.; TALAAT, S.; ELRAZEK, A.A.; IBRAHM, M.; HEENEMANN, K.; VAHLENKAMP, T. Isolation and full genome characterization of avina influenza subtype H9N2 from poultry respiratory disease outbreak in Egypt. **Virus Genes**, 50:389-400, doi:10.1007/s11262-015-1188-7, 2015.
- SILVA, J.A.; AZERÊDO, G.A.; BARROS, C.M.R.; COSTA, E.L.; FALCÃO, M.M.S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Higiene Alimentar**, v.16, n.100, p.97-101, 2002.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 536p., 2007.
- SOUZA, G.C.; GONSALVEZ, H.R.O.; GONSALVES, H.E.O.; COÊLHO, J.L.S. Característica microbiológica da carne de frango. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.10, n.2, p.12-17, 2014.
- TESSARI, E.N.C., CARDOSO, A.L.S.P.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z.; LUCIANO, R.L.; CASTRO, A.G.M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frandos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.9, p.2557-2560, 2008.
- THOMAS, C.J.; McMEEKIN, T.A. Contamination of broiler carcass skin during comercial processing procedures: na eléctron microscopic study. **Applied and Environmental Microbiology**, v.40, n.1, p.133-144, 1980.
- TREMBLAY, J.; SINGH, K.; FERN, A.; KIRTON, E.; HE, S.; WOYKE, T.; LEE, J.; CHEN, F.; DANGL, J.; TRINGE, S. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v.6, Article 771, p.1-15, 2015.

VIDENSKA, P.; RAHMAN, Md. M.; FALDYNOVA, M.; BABAK, V.; MATULOVA, M.E.; RADOVCIC-PRUKNER, E.; KRIZEK, I.; MOZINA-SMOLE, S.; KOVAC, J.; SZMOLKA, A.; NAGY, B.; SEDLAR, K.; CEJKOVA, D.; RYCHLIK, I. Characterization of egg laying hen and broiler fecal microbiota in poultry farms in Croatia, Czech Republic, Hungary and Slovenia. **PLoS ONE**, v.9, n.10, e110076, 2014.

VON RÜCKERT, D.A.S.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, B.M.; MOREIRA, M.A.S.; RODRIGUES, A.C.A. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 2, p. 326-330, Mar. 2009.

WAITE, D.W. & TAYLOR, M.W. Characterizing the Avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. **Frontiers in Microbiology**, v.5, p.1-12, 2014.

WHYTE, P.; MCGILL, K.; MONAHAN, C.; COLLINS, J.D. The effect of sampling time on the levels of microorganisms recovered from broilers carcasses in a comercial slaughter plant. **Food Microbiology**, v.21, n.1, p.59-65, 2004.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **Bmc Bioinformatics**, v.17, n.135, p.1-8, 2016.

YEOMAN, C.J.; CHIA, N.; JERALDO, P.; SIPOS, M.; GOLDENFELD, N.D.; WHITE, B.A. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. **Animal Health Research Reviews**, n.13, v.1, p.89-99, 2012.

ZHANG, W.; LI, L.; DENG, X.; KAPUSINSZKY, B.; DELWART, E. What is for dinner? Viral metagenomics of US store bought beef, pork, and chicken. **Virology**, v.468-470, p.303-310, 2014.

ZHAO, L.; WANG, G.; SIEGEL, P.; HE, C.; WANG, H.; ZHAO, W.; ZHAI, Z.; TIAN, F.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; SUN, Z.; CHEN, W.; ZHANG, Y.; MENG, H. Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. **Scientific Reports**, v.3, p.1163-1169, 2013.

ZHAO, Z.; MA, F.; WEI, L.; CHUA, H.; CHANG, C.C.; ZHANG, X.J.; Electricity generation from cattle dung using microbial fuel cell technology during anaerobic acidogenesis and the development of microbial populations. **Waste Management**, v.32, n.9, p.1651-1658, doi.org/10.1016/j.wasman.2012.04.013, 2012.

ZOU, W.; YE, G.; ZHANG, K. Diversity, function, and application of *Clostridium* in Chinese strong flavor Baijiu ecosystem: a review. **Journal of Food Science**, v.83, n.5, p.1193-1199, doi.org/10.1111/1750-3841.14134, 2018.