

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CIBELI VIANA

USO DE ASPERSÃO DE ÁGUA SOBRE A CONTAMINAÇÃO SUPERFICIAL DE
ESTEIRAS SANITÁRIAS CONDUTORAS DE CORTES DE FRANGO EM
FRIGORÍFICOS DE AVES



PALOTINA

2014

CIBELI VIANA

USO DE ASPERSÃO DE ÁGUA SOBRE A CONTAMINAÇÃO SUPERFICIAL DE
ESTEIRAS SANITÁRIAS CONDUTORAS DE CORTES DE FRANGO EM
FRIGORÍFICOS DE AVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

V614 Viana, Cibeli

Uso de aspersão de água sobre a contaminação superficial de esteiras sanitárias condutoras de corte de frango em frigoríficos de aves / Cibeli Viana; Orientador, Luciano dos Santos Bersot - Palotina, PR, 2014.

50p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR -- Área de concentração em Microbiologia Aplicada à Produção. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

1. Ciência Animal . 2. Coliformes - Contaminação. 3. Esteiras condutoras - Frango . 4. *Salmonella*. I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título

CDU 579.67

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



TERMO DE APROVAÇÃO

CIBELI VIANA

**“USO DE ASPERSÃO DE ÁGUA SOBRE A CONTAMINAÇÃO SUPERFICIAL DE
ESTEIRAS SANITÁRIAS CONDUTORAS DE CORTES DE FRANGO EM FRIGORÍFICOS
DE AVES”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Presidente/Orientador: Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Sílvia Cristina Osaki
Membro: Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Membro: Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho

Palotina, 20 de março de 2014

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Cibeli Viana, filha de Carlos Volnei Viana e Janemari Somensi Viana. Natural de Chapecó-SC 05/11/1987. Médica Veterinária formada no ano de 2010 pela Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina. Residente do programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - Campus de Botucatu na área de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (2010 - 2012). Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na área de Microbiologia aplicada à Produção Animal.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Jane, pelo exemplo de determinação, pelo apoio dado em todos os momentos, por acreditar em mim e pela compreensão com minha ausência durante toda esta trajetória.

Ao meu irmão, Caio, pelo carinho, confiança e pelos momentos de descontração proporcionados.

À minha avó, por todo tempo e “amor de vó” que é único e diferente, dedicado a mim desde 2005.

À minha tia Magda, que mais parece uma irmã, pela amizade e pelos conselhos dados. Ao meu tio Ademir, pela ajuda em todos os momentos que necessitei. Ao meu primo Antoe, pelo carinho e companhia mesmo nos dias mais difíceis. À minha prima Vitória, que apesar de sua pouca idade, sempre entendeu a falta de tempo e energia.

Ao meu namorado, Guilherme, que compreendeu meus momentos de ausência, preocupações e ansiedades e que sempre me motiva a continuar o caminho. Obrigada pelo amor, companheirismo, incentivo e paciência, durante os últimos anos.

Às minhas amigas da graduação Lela, Nathi, Nica e Ziza, que apesar da distância ainda me proporcionam muitos momentos de alegria.

À minha colega de trabalho e amiga Vanessa, por tudo o que fez durante a execução do projeto, desde a ajuda profissional até a companhia descontraída no tempo no laboratório.

Ao amigo Juliano que sempre esteve disposto e ajudou em muitas situações importantes.

Aos colegas e amigos de laboratório, Claudia e Nelson, que estiveram comigo desde o começo. Obrigada pela companhia e pelo auxílio em diversas ocasiões; e aos demais companheiros também: Camila, Rosangela, Jorge e Ana Paula, por toda a contribuição e tempo dedicados ao projeto.

À Rosana, Mallu, Fabi, e Krishna pela ajuda no laboratório, pela convivência e amizade fora dele.

Aos colegas do Serviço De Orientação À Alimentação Pública da UNESP – Botucatu (SOAP): Cid e Spina pelo tempo e trabalho dedicados ao projeto e também pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Viçosa, pela receptividade e gentileza com que me receberam.

Ao professor Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto, por ter aceitado o convite para participar da banca e por ter me acolhido e orientado no programa de residência em Botucatu.

À professora Silvia por ter aceitado o convite para participar da banca e pela contribuição acadêmica na disciplina ofertada.

Ao professor Dr. Luciano dos Santos Bersot, pela orientação não só no mestrado, mas em toda a vida acadêmica, pela oportunidade de crescimento, pelos conselhos, amizade e pela confiança.

À Deus, que acredito guiar todos os meus passos.

RESUMO

O Paraná é o maior produtor de frangos do Brasil, utilizando processos altamente tecnificados. A obtenção dos cortes de frangos se dá quase que exclusivamente em sistemas de esteiras contínuas que são higienizadas continuamente com o auxílio de aspersão de água. Acredita-se que o uso desta água, apesar de auxiliar fisicamente na remoção das sujidades, possa promover uma maior dispersão de matéria orgânica acabando por permitir a disseminação de micro-organismos. Desta maneira o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do uso de aspersão contínua de água nas esteiras condutoras de cortes de frango. As coletas foram realizadas em quatro frigoríficos de grande porte, em dois tipos de esteiras (modulares e lisas) com e sem o uso da aspersão de água. As coletas foram realizadas em quatro momentos diferentes, sendo o primeiro momento antes do início das operações e os outros três momentos distribuídos em intervalos regulares ao longo do dia. Pesquisou-se a presença de *Salmonella* sp. e realizou-se a contagem de coliformes a 35°C e *Escherichia coli*. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que em relação à presença de *Salmonella* sp. em esteiras do tipo lisa não houve diferença significativa entre o uso ou não da aspersão contínua de água na esteira, porém para as esteiras do tipo modular a utilização da aspersão contínua de água apresentou redução de micro-organismos estatisticamente significativo. Enquanto que nas contagens de coliformes a 35°C para esteiras lisas não houve diferença entre o uso ou não do protocolo de higienização com água, porém nas esteiras do tipo modular observou-se diferença quanto a este parâmetro. Para o micro-organismo *Escherichia coli* o uso da água foi estatisticamente significativo independente do tipo de esteira avaliado.

Palavras-Chave: coliformes a 35°C, esteiras condutoras de frango, *Salmonella* sp., superfície.

THE USE OF WATER UNDER PRESSURE ON THE SUPERFICIAL CONTAMINATION IN CONVEYOR BELTS FOR POULTRY CUTS IN POULTRY SLAUGHTERHOUSES

The greatest producer state of poultry in Brazil is Paraná, through highly technified processes. The production of meat cuts are almost exclusively obtained with conveyor belts systems which are regularly cleaned with water spray. It's believed that the use of this water, even though helping the remove of dirtiness, can promote a higher dispersion of organic material allowing the dissemination of microorganisms. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the regularly spray of water on the conveyor belt of chicken cuts. The samples were collected in 4 (four) large slaughter plants from 2 (two) different types of conveyor belts (modular and smooth) with or without the water spray. These samples were collected in four different times, with the first before the operation to start and the three others distributed in regular intervals throughout the day. The presence of *Salmonella* sp. was searched and it was done the counting of coliforms at 35°C and *Escherichia coli*. According to the results, it can be observed that comparing the presence of *Salmonella* sp. to the regularly use of spray of water, was not significant on the smooth conveyor belt; however it was significant on the modular conveyor belt. On the coliforms at 35°C counting, from the smooth conveyor belt, no difference between using or not the water cleaning protocol was observed; however on the modular conveyor belt, difference was observed at this parameter. To the *Escherichia coli* microorganism the regularly water spray was significant regardless the type of conveyor belt.

Keywords: coliforms at 35°C, poultry conveyor belts, *Salmonella* sp., surface.

LISTA DE ABREVIATURAS

APPCC	- Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APT	- Água Peptonada Tamponada
BPF	- Boas Práticas de Fabricação
BS	- Ágar Bismuto de Sulfito
LCA	- Lisa com aspensão
LIA	- Lisina Iron Agar
LSA	- Lisa sem aspensão
MSA	- Modular sem aspensão
MCA	- Modular com aspensão
OR	- Odds Ratio
PCR	- Polymerase chain reaction
PPHO	- Procedimento Padrão de Higiene Operacional
RV	- Rappaport-Vassiliadis
TSI	- Triple Sugar Iron
TT	- Tetracionato
UFC	- Unidade Formadora de Colônias
VM	- Vermelho de Metila
VP	- Vogues Proskauer
XLD	- Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Pares de oligonucleotídeos a serem utilizados para reação da polimerase em cadeia na pesquisa de <i>Salmonella</i>	30
Tabela 2.	Análise univariada do isolamento de <i>Salmonella sp.</i> em diferentes salas de cortes, diferentes esteiras e diferentes momentos.....	33
Tabela 3.	Comparação entre as esteiras com e sem o uso de aspersão contínua de água.	34
Tabela 4.	Comparação entre a frequência de <i>Salmonella sp.</i> (%) durante os momentos de coleta.	38
Tabela 5.	Comparação entre os momentos em cada tipo de esteira separadamente.	39
Tabela 6.	Comparação geral entre as esteiras modulares e lisas, com e sem aspersão de água (Log de UFC/cm ²).	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esteira condutora de cortes de frango do tipo modular.....26
- Figura 2. Esteira condutora de cortes de frango do tipo lisa.27
- Figura 3. Visualização dos fragmentos amplificados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores SIFBF e SIFBR. 1- Controle positivo: *Salmonella* Enteritidis ATCC CT258. 2- Controle positivo *Salmonella* Braenderup ATCC H9812. 3 e 4 Exemplos de amostras positivas. 5 – Controle negativo: água.....31
- Figura 4. Frequência de *Salmonella* sp. encontrada na sala de cortes 1 de acordo com o tipo de esteira. Letras iguais significam que os resultados não diferem significativamente ($P > 0,05$) LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso de aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água.35
- Figura 5. Frequência de *Salmonella* sp. encontrada na sala de cortes 2 de acordo com as esteiras. Letras iguais significam que os resultados não diferem significativamente ($P > 0,05$). LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água.36
- Figura 6. Frequência de *Salmonella* sp. na sala de cortes 3 de acordo com as esteiras. Letras diferentes significam que os resultados diferem entre si ($P < 0,05$). LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água.36
- Figura 7. Frequência de *Salmonella* sp. encontrada na sala de cortes 4 de acordo com as esteiras. Letras diferentes significam que os resultados diferem entre si ($P < 0,05$) LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água.37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1	<i>Salmonella</i> sp.....	14
3.2	<i>Salmonella</i> sp veiculada por produtos de origem avícola e prevalência de <i>Salmonella</i> sp. nestes produtos.....	15
3.3	Importância da quantificação de Micro-organismos Indicadores de higiene do processamento de alimentos.....	19
3.4	Contaminação cruzada x <i>Salmonella</i> sp.....	21
3.5	Biofilmes produzido por <i>Salmonella</i> sp.....	22
3.6	Procedimentos padrão de higiene operacional na indústria de alimentos.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	Material.....	26
4.2	Métodos.....	27
4.2.1	Coleta de amostras.....	27
4.2.2	Local de realização das análises.....	28
4.2.3	Método de tomada de amostra para coliformes a 35°C e <i>E. coli</i>	28
4.2.4	Método de tomada de amostra para Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	28
4.2.5	Análises Microbiológicas.....	29
4.2.5.1	Coliformes a 35°C e <i>E.coli</i>	29
4.2.5.2	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	29
4.2.6	Análise estatística.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. ao longo do processo.....	33
5.2	Coliformes a 35°C e <i>Escherichia coli</i>	39
6	CONCLUSÕES.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Paraná é o maior produtor de frangos do Brasil, com destaque para a região oeste do Estado. Essa posição frente ao mercado avícola brasileiro se deve, em grande parte, pela modernização do setor e adequação das plantas frigoríficas com o objetivo de atender os mercados interno e externo, produzindo, além de carcaças inteiras, cortes especializados demandados por países da Europa, Ásia e África.

O abate e a obtenção de cortes de frango nestas indústrias são processos que utilizam de muita tecnologia atendendo ao grande volume de abate, muitas vezes superiores a 9.000 frangos por hora. Para que seja possível a realização de cortes padronizados e com qualidade a velocidade do processo tem de ser alta, e uma das maneiras de garantir que isso seja possível, é que o transporte das carcaças e cortes de frangos sejam realizados exclusivamente em sistemas de esteiras contínuas. Além de aumentar a velocidade e direcionamento dos cortes dentro das salas de processamento, há uma significativa redução do contato manual e a redução de mão-de-obra. Por sua vez, estas esteiras, por entrarem em contato direto com as carcaças de frango e seus cortes, vão sofrendo contaminações sucessivas ao longo do processo e, desse modo, necessitam ser higienizadas continuamente com o auxílio de aspersão automática de água.

Contudo, acredita-se que a água, apesar de sua ação física contínua na remoção de matéria orgânica, possa vir a promover uma maior dispersão desse material acabando por permitir a disseminação de micro-organismos que contaminariam os produtos de forma gradativa e contínua nestas superfícies. Baseando-se neste princípio, avaliar a possibilidade da retirada da água neste processo de higiene operacional deve ser uma hipótese a ser investigada. Adicionalmente, a não utilização da água nesta etapa do processo, contribuiria significativamente com redução de gastos na indústria e diminuição da emissão de efluentes com alta carga de matéria orgânica no meio ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do uso de aspersão de água sob pressão como forma de higiene operacional sobre a frequência de *Salmonella* sp. e a quantificação de micro-organismos indicadores em esteiras sanitárias condutoras de cortes de frango em indústrias de processamento de aves.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do uso do protocolo de higienização com água sob pressão sobre a contaminação em dois tipos de esteiras sanitárias, modulares e lisas.
- Comparar as contaminações por coliformes a 35°C em esteiras submetidas a protocolos de higienização com água sob pressão e esteiras que não foram submetidas ao protocolo.
- Comparar as contaminações por *Escherichia coli* em esteiras submetidas a protocolos de higienização com água sob pressão e esteiras que não foram ao protocolo.
- Comparar as frequências de contaminação por *Salmonella* sp. em esteiras submetidas a protocolos de higienização com água sob pressão e esteiras que não foram submetidas ao protocolo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, é um micro-organismo na forma de bacilo, Gram negativo, não formador de esporos e anaeróbio facultativo, sendo que a maioria dos sorovares é móvel e possuem flagelos peritríquios, com exceção de *Salmonella Pullorum* e *Gallinarum* (DOYLE; CLIVER, 1990; DUNKLEY et al., 2009).

Kauffmann-White, na década de 50, apresentaram um esquema de sorotipagem, baseado na classificação dos antígenos de superfície O (somático) e do H (flagelar), tornando este método um padrão internacional, sendo utilizado até hoje (DUNKLEY et al., 2009).

Seguindo-se este esquema, o gênero *Salmonella* é compreendido pela divisão em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* and *S. enterica* subsp. *indica*. Dentre os 2610 sorovares listados, 1547 deles, pertencem à *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, sendo estes os sorovares predominantes em casos de doenças veiculadas por alimentos (GUIBOURDENCHE et al., 2010; MEAD et al., 2010).

Salmonella sp. encontra-se amplamente distribuída na natureza, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios naturais (HUR; JAWALE; LEE, 2012), podendo ser encontrada no trato intestinal de mamíferos, aves, anfíbios e répteis (HUR; JAWALE; LEE, 2012; NOTERMANS; KAMPELMACHER, 1975).

Alguns sorovares estão associados diretamente a hospedeiros específicos: *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A* e *C*, por exemplo, são agentes das febres tifoides e paratífoides, respectivamente e estão adaptadas aos seres humanos; já *Salmonella Pullorum* e *Gallinarum* encontram-se adaptados às aves, *Salmonella Dublin*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Abortusovis* e *Salmonella Abortusequi* a bovinos, a suínos, ovelhas e equinos, respectivamente (HUR; JAWALE; LEE, 2012; L PLYM; WIERUP, 2006; TURNER et al., 1998). No caso das aves, estes

também podem atuar como reservatórios de vários outros sorovares de *Salmonella*, capazes de infectar humanos (NÓGRÁDY et al., 2012).

3.2 *Salmonella* sp VEICULADA POR PRODUTOS DE ORIGEM AVÍCOLA E PREVALÊNCIA DE *Salmonella* sp. NESTES PRODUTOS

Dados mundiais de 1988 a 2007 relatam que *Salmonella* foi o agente etiológico em 46,9% dos 4.093 surtos relatados que tiveram o agente identificado durante esse período (GREIG; RAVEL, 2009). De acordo com os dados da EFSA (European Food Safety Authority), em 2011 foram relatados 5.648 surtos de origem alimentar totalizando 69.553 casos humanos, 7.125 hospitalizações e 93 mortes (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013). O principal agente etiológico envolvido em surtos foi *Salmonella* (26,6% dos surtos), seguido por toxinas bacterianas (12,9%), *Campylobacter* (10,6%) e os vírus (9,3%). Dados estadunidenses indicam que entre os anos de 1998 e 2008, dos 5.059 surtos em que a causa foi confirmada, o agente etiológico envolvido com maior frequência foi norovírus (39%) seguido de *Salmonella* (26%), nos anos de 2009 e 2010 no mesmo país dos 790 surtos com etiologia confirmada *Salmonella* foi responsável por 234 (30%) (CDC, 2013; GOULD et al., 2013).

No Brasil, segundo dados divulgados pela Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS), do Ministério da Saúde, durante o período de 2000 a 2011, *Salmonella* spp. foi o micro-organismo mais associado a toxi-infecções alimentares, tendo sido identificado como o agente etiológico em cerca de 1.660 surtos no período (BRASIL, 2011).

No estado do Paraná em pesquisa realizada envolvendo surtos de 1978 até 2000, constatou que dos 1.195 dos surtos de origem bacteriana 492 (41,2%) foram causados por *Staphylococcus aureus*, enquanto 404 (33,8%) foram causados por *Salmonella* sp. (VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006).

Nos países membros do *Codex Alimentarius*, entre os alimentos veiculadores de *Salmonella* sp. aos humanos, os produtos avícolas como ovos e carcaças de frangos, figuram como os mais importantes (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 2005). Dos 1.918 surtos relatados em diversos países, em

que o agente etiológico envolvido foi *Salmonella*, 59% deles estavam associados à carne de frango (GREIG; RAVEL, 2009).

Nos surtos causados por *Salmonella* na União Europeia em 2011, os ovos e produtos a base de ovos foram os veículos alimentares mais frequentemente identificados, associados a 50,5% desses surtos. Enquanto que alimentos considerados mistos foram responsáveis por 7,4% dos surtos de salmonelose, seguido por doces e chocolates (6,7%), produtos de panificação (4,2%), carne de frango (3,2 %), carne bovina (2,8%) e carne de porco (4,6%) (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013).

Nos Estados Unidos, surtos causados por *Salmonella* entre os anos de 1998 e 2008 foram associados mais comumente com frangos (30%) e ovos (24%). Surtos causadas por *Salmonella* Enteritidis foram associados aos ovos (64%) e frangos (18%). Frango também foi o alimento mais comumente implicado em surtos causados pelo sorotipo Typhimurium. Nos anos de 2009 e 2010 entre surtos em que o agente etiológico foi identificado e associado ao alimento, a maioria dos surtos causados por *Salmonella* sp. foi atribuída aos ovos (CDC, 2013; GOULD et al., 2013).

Welker et al. (2010) analisaram 186 surtos associados a alimentos contaminados no Rio Grande do Sul em 2006 e 2007, ao avaliar os alimentos relacionados, verificaram que os produtos cárneos foram os principais envolvidos nos surtos investigados (36%), seguidos de pratos preparados (20%) e saladas (15%). No mesmo estado na análise dos surtos de salmonelose ocorridos de 1997 a 1999, as saladas com maionese caseira foram os principais alimentos envolvidos (COSTALUNGA; TONDO, 2002).

Entre 2002 e 2004, avaliaram-se diversos surtos causados por *Salmonella* sp. no Estado do Rio Grande do Sul, sendo que em 202 deles foi possível identificar 256 veículos alimentares distintos, sendo a salada de batata com maionese caseira o mais prevalente (53,51%), seguido por carne e seus derivados (21,48%) (WAGNER; SILVEIRA; TONDO, 2013).

No Estado no Paraná, no período de 1999 a 2008 foram investigados 286 surtos causados por *Salmonella* sp. tendo sido constatado que em 45,0% estiveram associados alimentos à base de ovos, em 34,8% carnes e derivados e em 20,2% classificados como alimentos variados, tais como queijos (1,0%), saladas (de tomate, repolho, couve, milho e ervilha) (4,8%), arroz cozido, extrato de tomate,

fritas, mandioca, mousse, pudim, sorvetes, farofa, pavê e massas prontas (14,4%) (KOTTWITZ et al., 2010).

Com relação à prevalência de *Salmonella* sp. em carcaças e cortes de frangos, são inúmeros os estudos realizados em todo o mundo. Tais levantamentos indicam alta prevalência de *Salmonella* sp. em carne de aves e em ambiente de processamento de frango e derivados, o que ressalta a preocupação com o controle de *Salmonella* sp. nesta espécie animal (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ et al., 2012; DONADO-GODOY et al., 2012; HUE et al., 2011; MEDEIROS et al., 2011; SAKARIDIS et al., 2011).

Sakaridis et al. (2011) avaliaram 150 amostras de carcaças de frango em matadouros-frigoríficos do norte da Grécia, encontrando 37% (56/150) de carcaças positivas para *Salmonella* sp., sendo que a prevalência entre os abatedouros pesquisados variou entre 12% e 80%.

Na Rússia a prevalência média de *Salmonella* sp. no ano de 2012 foi de 31,5%, considerando 698 amostras coletadas no mercado varejista de três diferentes regiões (ALALI et al., 2012).

Donado-Godoy et al. (2012) na Colômbia, demonstrou que em um total de 1003 carcaças de frango analisadas, a prevalência geral de *Salmonella* sp. foi de 27%.

No Brasil há uma evidente variação na frequência de *Salmonella* sp. encontrada em carcaças de frango.

Medeiros et al. (2011) através do programa PREBAF, o programa de monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Enterococcus* sp. e *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil, de 2004 a 2006 constataram que de um total de 2679 carcaças de frango congeladas coletadas no comércio varejista de 15 cidades brasileiras a prevalência de *Salmonella* spp. foi de 2,7%, com variação na prevalência de zero, em Vitória, até 8,9% em São Paulo.

Na região Nordeste, 260 carcaças de frango foram analisadas entre abril e dezembro de 2004, sendo que 25 (9,6%) foram positivas para *Salmonella* e *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar predominante (DUARTE et al., 2009).

No ano de 2001, foram analisadas 96 amostras de carcaças de frangos provenientes de abatedouros de aves, localizados em diferentes regiões do Estado de Goiás, das amostras analisadas 19,% foram positivas para *Salmonella* spp.,

sendo encontrados cinco sorovares diferentes, e 63% das amostras positivas o sorovar encontrado foi *Salmonella* Enteritidis (REZENDE et al., 2005).

Em Manaus – AM, no período de março a maio de 1998, foram analisadas 60 amostras de carcaças de frangos, coletadas em feiras livres e mercados registrados. Das 60 amostras analisadas, 30 (50%) foram positivas para *Salmonella* spp. sendo que *Salmonella* Panama foi o sorovar encontrado com maior frequência. (TIROLLI; COSTA, 2006).

Matias et al. (2010) e Cossi et al. (2012) em Viçosa – MG comprovaram a presença de *Salmonella* sp. em 6,6 e 3,3% das carcaças avaliadas respectivamente.

No Estado de São Paulo, analisando 60 carcaças de um mesmo estabelecimento, a presença de *Salmonella* spp foi detectada em 42% das carcaças. Dezesete sorotipos foram detectados, *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo predominante, em seguida *Salmonella* Albany e *Salmonella* Hadar (FUZIHARA; FERNANDES; FRANCO, 2000). No mesmo Estado Tessari et al. (2008) encontraram uma positividade para *Salmonella* de 2,5% das 116 carcaças analisadas. Já no ano de 2012 em Botucatu – SP a frequência de isolamento do patógeno foi de 60% de todas as amostras analisadas (YAMATOGLI et al., 2012).

Na região sul do Brasil, em uma pesquisa feita em 61 cortes de frangos encontrou-se uma positividade de 39,3% dos cortes analisados, sendo *Salmonella* Enteritidis o sorovar predominante em 84% das amostras positivas (RIBEIRO et al., 2007).

No Estado do Paraná em dois trabalhos realizados na região oeste, verificou-se que a positividade para *Salmonella* sp. foi de 28% em 60 carcaças analisadas no ano de 2012, enquanto que no ano de 2013, em 40 carcaças analisadas, encontrou-se 35% de amostras positivas (DRUZIANI et al., 2013; SERENO et al., 2012).

Algumas etapas do processamento são consideradas críticas na contaminação das carcaças e cortes como a escaldagem, a depenagem, a evisceração e o resfriamento dos produtos (MEAD et al., 2010).

A escaldagem tem como objetivo facilitar o processo de depenagem subsequente. No entanto, como as carcaças possuem uma grande carga microbiana na pele, penas e região cloacal, pode acontecer a contaminação da água utilizada

no processo e, mesmo com a utilização de temperaturas elevadas, tem-se o risco de contaminação cruzada das carcaças por *Salmonella* (CASON; HINTON JR, 2006).

A depenagem é considerada uma etapa crítica já que pode ocorrer dispersão do material fecal residual das carcaças para os “dedos” de borracha da depenadeira tornando a contaminação cruzada inevitável, além da dificuldade de limpeza e higienização da mesma contribuindo para a disseminação do patógeno (MEAD et al., 2010).

A evisceração das carcaças normalmente é realizada em grandes frigoríficos de forma automatizada, composta por uma série de máquinas automáticas dedicadas cada uma delas a uma função específica. O cuidado com configuração dos equipamentos é necessário para evitar a ruptura dos intestinos e consequentemente evitar a contaminação fecal. A etapa de evisceração pode contribuir significativamente para um aumento na prevalência de *Salmonella* (MEAD et al., 2010; BUNCIC & SOFOS, 2012).

O processo de resfriamento das carcaças é realizado normalmente por imersão das carcaças em tanques de água fria (com ou sem a adição de gelo). Este sistema de imersão contínua (“chiller”) tem um efeito de lavagem que reduz a contaminação microbiana e é capaz de resfriar as carcaças de frango a temperaturas de 4°C ou inferiores, impedindo a multiplicação das células de *Salmonella* durante esta etapa. O acúmulo de bactérias nos tanques, embora parcialmente controlado pela reposição da água, possibilita a ocorrência de contaminação cruzada das carcaças, tornando esta etapa extremamente crítica, especialmente no tocante a *Salmonella* (MEAD et al., 2010; CARRASCO et al., 2012).

3.3 IMPORTÂNCIA DA QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE DO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

A pesquisa de micro-organismos indicadores é de fundamental importância já que fornece informações sobre condições higiênicas da produção que podem sugerir a presença de patógenos (CAPITA et al., 2003; GHAFIR et al., 2008).

Segundo a *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) micro-organismos indicadores podem ser divididos em dois grupos

distintos (1984), aqueles que não oferecem risco direto e os que oferecem risco baixo ou indireto à saúde, conforme exemplos:

- a) Micro-organismos que não oferecem risco direto à saúde: contagem padrão de mesófilos, contagem de psicrotróficos e termófilos, contagem de bolores e leveduras;
- b) Micro-organismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes a 35°C, coliformes a 45°C, enterococos, enterobactérias e *Escherichia coli*.

Os coliformes fazem parte da família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram negativos e não formadores de esporos. Além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo. Tais micro-organismos têm várias características em comum com espécies do gênero *Salmonella* e *Shigella*, das quais todas são patogênicas, entretanto, a principal diferença bioquímica característica é que os coliformes fermentam a lactose com a produção de ácido e gás, enquanto *Salmonella* e *Shigella* não (CHAN; KRIEG; PELCZAR JR, 1997).

A análise de micro-organismos indicadores além de ser de custo inferior que o teste de patógenos, pode alertar os processadores sobre situações em que a contaminação ocorre, independentemente se patógenos estão ou não envolvidos. (RUBY; ZHU; INGHAM, 2007). Quando presentes os micro-organismos indicadores evidenciam uma possível presença de patógenos e/ou micro-organismos deteriorantes, indicando assim uma falha na qualidade de higiene do processamento, dos operadores, das instalações ou da produção primária (GHAFIR et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008).

Alguns estudos tem sugerido que os níveis de contaminação de micro-organismos indicadores não se correlacionam diretamente com prevalência do patógeno, sendo assim não é uma ferramenta útil para avaliar a presença ou ausência do mesmo. Em uma pesquisa feita avaliando 210 carcaças de frango retiradas ao longo da linha de abate não houve correlação nos níveis de contaminação de micro-organismos mesófilos aeróbios viáveis, *Salmonella* e *Campylobacter* spp. (CASON et al., 1997). Em contra partida outros autores garantem que a presença do patógeno está, na maioria das vezes, associada à presença de micro-organismos indicadores (RUBY; ZHU; INGHAM, 2007). Em um estudo envolvendo dois abatedouros, os autores encontraram forte relação entre a

presença de micro-organismos mesófilos aeróbios viáveis e enterobactérias com a presença de *E.coli* O157 que tem caráter altamente patogênico (ARTHUR et al., 2004).

3.4 CONTAMINAÇÃO CRUZADA X *Salmonella* sp.

Salmonella sp. não é considerado um micro-organismo resistente ao calor e, desse modo, pode ser facilmente destruído quando submetido a temperaturas de cozimento. Contudo, quando o centro do alimento, principalmente ovos e carne de frango, não atinge a temperatura mínima para eliminação do patógeno pode se tornar um risco ao consumidor. Além do cozimento inadequado a contaminação dos alimentos pode ocorrer de forma indireta, onde superfícies e objetos que entram em contato com o alimento cru podem fazer o papel de carreador do patógeno ao alimento já pronto para o consumo (LUBER, 2009).

A contaminação cruzada ligada a alimentos crus e/ou processados contaminados por superfícies que entram contato do alimento tem sido identificada como um evento perigoso (BARNES et al., 1999). Na França, Haeghebaert et al. (2002) constataram que dos 241 surtos ocorridos em que pelo menos um fator que contribuiu para contaminação foi identificado, 59 estavam associados a contaminação de equipamentos.

Em um estudo realizado no ano de 2010, avaliou-se a taxa de transferência de *Salmonella* para superfícies de corte de diferentes materiais (madeira, vidro, aço inoxidável e plástico) e submetidos a diferentes procedimentos de higienização. O patógeno foi inoculado e recuperado a partir de todas as superfícies quando as mesmas não foram higienizadas. Entre as superfícies analisadas, madeira foi a mais difícil de higienizar e a superfície de aço inoxidável a mais fácil. A limpeza com água fria e sabão seguido por esfregação vigorosa e enxágue, podem reduzir, mas não eliminar o risco de exposição ao patógeno. Ao comparar os diversos procedimentos de limpeza e tipos de superfícies, a tábua de aço inoxidável higienizada com água e sabão, enxaguado e desinfetado com hipoclorito mostrou ser o material e procedimento mais seguro, alcançando o menor nível de contaminação cruzada (SOARES et al., 2012).

Alguns patógenos alimentares como *Salmonella* sp., são capazes de se manter viáveis em superfícies, mesmo que sob ambiente refrigerado, por longos períodos de tempos, tornando-se uma potencial fonte de contaminação para os demais produtos (JACKSON et al., 2007; MATTICK et al., 2003).

Jiménez et al. (2009) estudaram as condições de refrigeração que afetam a sobrevivência e a taxa de transferência de *Salmonella* Hadar inoculada na pele de frango e transferida para uma tábua de corte de plástico. Os autores constataram que houve transferência do micro-organismo e a taxa de transferência foi independente da temperatura (2°C, 6°C e 8°C) existindo a probabilidade de contaminação cruzada.

3.5 BIOFILMES PRODUZIDO POR *Salmonella* sp.

De uma maneira geral, biofilmes podem ser definidos como uma comunidade de micro-organismos com elevado grau de organização que se adere a uma superfície de modo isolado ou combinado, ligados por uma matriz extracelular presa às superfícies sólidas (COSTERTON et al., 1995; JAY, 2005).

A formação de biofilme é um processo complexo e que envolve diversas etapas:

Primeira etapa: As superfícies são revestidas com um filme condicionante orgânico representado por resíduos proteicos, lipídicos e carboidratos com a participação da umidade da superfície como fator primordial para a formação do filme condicionante (MITTELMAN, 1998).

Segunda etapa: Transporte dos micro-organismos para a superfície e formação de ligações entre a parede das células e o filme condicionante de forma reversível. A adesão reversível se dá pela interação inicial do micro-organismo com o substrato envolvendo forças facilmente destrutíveis (forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interação hidrofóbicas) (COSTERTON et al., 1995; WATNICK; KOLTER, 2000).

Terceira etapa (maturação do biofilme): O micro-organismo consolida a formação do biofilme pela produção de substâncias poliméricas extracelulares (Extracellular Polymeric Substance - EPS), o que os mantém fortemente aderidos às superfícies (COSTERTON et al., 1995; WATNICK; KOLTER, 2000).

Após ter sido formado um biofilme maduro, processo que pode ocorrer de três a seis dias após a adesão inicial e aumento da densidade populacional de micro-organismos, há o enfraquecimento da estrutura o que causa desprendimento de forma intermitente de células microbianas (HEYDORN et al., 2000; TRACHOO, 2003). Este processo terá duas consequências, a formação de novos biofilmes a partir destas células anteriormente aderidas e/ou a contaminação de produtos manipulados nestas superfícies.

Contudo, mesmo sem a maturação, células viáveis aderidas à superfície podem se desprender, o que é caracterizado como potencial de biotransferência. Este evento é definido como a capacidade que o micro-organismo presente na superfície possui de contaminar alimentos durante o processamento, antes ou após o procedimento de higienização (OLIVEIRA, 2010). Fatores que afetam o desprendimento do biofilme incluem a sua espessura, disponibilidade de nutrientes e fluxo aquoso que passa pelo local (TRACHOO, 2003).

Além da contaminação ocasionada por este desprendimento, quando biofilmes são formados, pode haver dificuldades no processo de higienização, devido à resistência que estes apresentam aos agentes antimicrobianos utilizados. Essa maior resistência pode estar relacionada a diferentes mecanismos onde a matriz polimérica pode funcionar como uma barreira protetora impedindo a ação dos agentes sanitizantes (GILBERT; ALLISON; MCBAIN, 2002).

Em diversas pesquisas *Salmonella* spp. foi recuperada a partir de diferentes superfícies de contato com alimentos, sendo um micro-organismo capaz de se fixar a superfícies inertes no ambiente de processamento de alimentos e formar biofilmes (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012).

Biofilmes formados por *Salmonella* e *E. coli* são comumente encontrados em equipamentos utilizados no processamento de aves, principalmente no abate, visto que é um ambiente úmido e rico em nutrientes, e portanto ideal para formação de biofilmes (CARY; LINZ; BHATNAGAR, 2000).

Pesquisas têm demonstrado que as salmonelas possui grande capacidade de formar biofilmes em superfícies como plástico, borracha, cimento, vidro e aço inoxidável (HURRELL et al., 2009; JOSEPH; OTTA; KARUNASAGAR, 2001; MØRETRØ et al., 2009; PROUTY; GUNN, 2003; SOLANO et al., 2002) Stepanovic et al. (2004) testaram 122 cepas isoladas de humanos, animais e alimentos cepas de *Salmonella* e concluíram que todas as cepas foram capazes de formar biofilmes

em microplacas de poliestireno. Kim e Wei (2007) demonstram que *S. Typhimurium* DT104 mostrou-se, dentre os patógenos alimentares testados (*S. Heidelberg*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*) capaz de formar o maior (ou mais forte) biofilme nas superfícies de aço inoxidável e vidro.

A dificuldade de remoção dos biofilmes levanta uma questão importante para a qualidade dos produtos manipulados em superfícies de equipamentos industriais, pois os micro-organismos que participam do processo de adesão podem ser deteriorantes e/ou patogênicos, gerando problemas de caráter econômico e de saúde pública.

3.6 PROCEDIMENTOS PADRÃO DE HIGIENE OPERACIONAL NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.

Diversos programas de controle de qualidade são desenvolvidos e aplicados pelas indústrias de alimentos com a intenção de garantir um produto o mais seguro possível ao consumidor. Os programas como Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), Boas práticas de fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) vêm sendo aplicados nas indústrias de carne de aves em diversos países.

O PPHO tem como finalidade descrever todos os procedimentos de limpeza e sanitização executados diariamente pelos estabelecimentos, com foco principal em superfícies e equipamentos que entram em contato com produtos prevenindo, desta forma, a contaminação cruzada. A higienização de superfícies de manipulação de alimentos é parte fundamental para a obtenção de produtos com qualidade microbiológica e que não ofereçam riscos de veiculação de patógenos aos consumidores.

O plano PPHO é composto pelas atividades pré-operacionais e operacionais. As pré-operacionais abrangem os procedimentos de higiene executados antes do início das atividades industriais e as operacionais compreendem a limpeza e sanitização dos equipamentos e utensílios durante a produção e nos intervalos entre turnos (BRASIL, 2003).

Em áreas de manipulação de produtos cárneos, especificamente em salas de cortes de frigorífico de aves, é comum e apropriado o uso de mesas contínuas conhecidas como esteiras sanitárias condutoras de produtos. A higiene operacional dessas esteiras com aspersão de água preferencialmente morna sob pressão é prática obrigatória, devido às exigências estabelecidas pela Portaria 210 do Serviço de Inspeção Federal de 1998 que entende que este é um processo de higiene operacional de fluxo contínuo, além de atender aos interesses sanitários dos países importadores (BRASIL, 1998).

Esse sistema de higienização com a utilização de água tem como finalidade evitar que a contaminação proveniente do alimento que entra em contato com a superfície não seja transferida aos novos produtos que são processados no mesmo local.

Em um estudo de caso realizado em um frigorífico de abate de aves no Estado do Paraná, não foram verificadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre o uso ou não da água na higienização de esteiras sanitárias nas contagens de microorganismos mesófilos e enterobactérias (SOARES et al., 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As amostras superficiais das esteiras foram colhidas em quatro plantas de abate e processamento de aves e derivados com as seguintes características: registro no Serviço de Inspeção Federal, habilitação para exportação (União Europeia, África do Sul, Japão, Hong Kong, Alemanha, Arábia Saudita e outros países) e abate acima de 160 mil aves/dia.

Foram colhidas amostras superficiais de esteiras sanitárias submetidas a dois protocolos operacionais:

- a) esteira submetida a processo de higienização contínua com água aquecida (45°C) sob pressão;
- b) esteiras sem processo de higienização contínua.

Também foram amostradas esteiras distintas submetidas aos mesmos protocolos descritos anteriormente: esteiras modulares fabricadas de polipropileno (Figura 1) e esteiras lisas fabricadas de poliuretano (Figura 2).



Figura 1. Esteira condutora de cortes de frango do tipo modular.



Figura 2. Esteira condutora de cortes de frango do tipo lisa.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas durante os dois turnos de trabalho em cada um dos quatro frigoríficos participantes, prevendo-se a coleta em quatro períodos distintos:

- 1ª coleta: logo após a higienização pré-operacional – T0
- 2ª coleta: após quatro horas de funcionamento do primeiro turno – T1
- 3ª coleta: após quatro horas de funcionamento do segundo turno – T2
- 4ª coleta: uma hora antes do término do segundo turno – T3

Foram realizadas 10 repetições do experimento em cada frigorífico e as análises foram tomadas em duplicata, em cada uma das duas esteiras avaliadas, modulares e lisas, submetidas aos dois protocolos de higienização.

4.2.2 Local de realização das análises

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA) da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

4.2.3 Método de tomada de amostra para coliformes a 35°C e *E. coli*

Para a tomada de amostras com vistas às contagens de coliformes a 35°C e *E. coli*, foi utilizada como referencial a metodologia sugerida pela Decisão nº 471/2001 (EC - EUROPEAN COMMUNITY - COMMISSION REGULATION, 2001). As amostras foram coletadas com uso de swabs esterilizados numa área pré-determinada de 20 cm² (moldes de 4 x 5 cm) tomados em amostras quintuplas a cada tempo. Dessa forma, cada conjunto de cinco swabs compôs um homogeneizado de 100 cm². Os swabs foram acondicionados em tubos tipo Falcon contendo 10 mL de solução salina peptonada 0,1%. Com isso, cada 1 mL da amostra analisada no laboratório correspondeu à contaminação de 10 cm² da superfície.

Para a coleta logo após a higienização pré-operacional (T0) foram utilizadas esponjas (Nasco Whirl-Pak™) pré-hidratadas com 10 mL de caldo Letheen. Foram amostradas áreas previamente delimitadas de 400 cm². As esponjas foram acondicionadas em bolsas plásticas estéreis e transportadas ao laboratório para a realização das análises propostas

4.2.4 Método de tomada de amostra para Pesquisa de *Salmonella* sp.

Para tomada de amostras visando à pesquisa de *Salmonella* foram utilizadas esponjas (Nasco Whirl-Pak™) pré-hidratadas com 10 mL de solução salina peptonada 0,1%. Foram amostradas áreas previamente delimitadas de 400 cm² de acordo com as recomendações feitas pelo Health Canada's (HEALTH CANADA, 2010). As esponjas foram acondicionadas em bolsas plásticas estéreis. As esponjas utilizadas na coleta do T0 foram pré-hidratadas com 10 mL de caldo Letheen.

Todas as amostras foram mantidas em caixa isotérmicas em temperatura máxima de 4°C até o momento da realização das análises.

4.2.5 Análises Microbiológicas

4.2.5.1 Coliformes a 35°C e *E.coli*

Os tubos contendo os swabs foram homogeneizados em equipamento do tipo vortex (Phoenix AP56) por um minuto e, a partir deste tubo, foram obtidas as diluições necessárias para inoculação em Petrifilm™ EC para contagem de coliformes a 35°C e *E. coli*. As placas foram incubadas a 35–37°C/48 horas. Após as contagens das colônias, o resultado foi expresso em UFC/cm².

Para análise do T0 foi adicionado ao saco plástico contendo a esponja, 90 mL de água peptonada tamponada (APT), foi realizada a homogeneização em *stomacher* (Seward 400) durante dois minutos e feita inoculação em Petrifilm™ EC.

4.2.5.2 Pesquisa de *Salmonella* sp.

A – Isolamento e confirmação bioquímica e sorológica

Para a detecção da presença de *Salmonella* foi utilizada a metodologia recomendada pela Food and Drug Administration (FDA – USA), publicada no Bacteriological Analytical Manual (ANDREWS; HAMMACK, 2007).

Ao saco plástico contendo a esponja utilizada na coleta de amostras foram adicionados 100 mL de água peptonada tamponada (APT). Após a adição do APT, foi realizada a homogeneização em *stomacher* (Seward 400) durante dois minutos e a amostra foi incubada a 35-37°C/24 horas. Após esse período, 1 mL foi semeado em tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo tetrathionato (TT) suplementado com 0,2 mL de iodeto de potássio (incubação a 35-37°C/24 horas) e 0,1 mL em um tubo com 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (incubação a 42°C/24 horas). Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e placas de ágar bismuto-sulfito (BS). As placas foram incubadas a 35-37°C/24 horas. As colônias em XLD e BS características de *Salmonella* foram isoladas e repicadas em tubos de ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA) para triagem bioquímica. Amostras características nestas provas foram submetidas ao teste sorológico (*polyvalent O antiserum* Bio-rad®) e a

testes bioquímicos adicionais como: teste de urease, teste de citrato de Simmons, teste de indol, teste de Vermelho de Metila (VM), teste de Voges-Proskauer (VP) teste de motilidade e teste do malonato.

Os achados confirmados no conjunto de provas bioquímicas e sorológicas foram submetidos à confirmação molecular do gênero por PCR, conforme descrição a seguir.

B – Confirmação molecular do gênero *Salmonella* por PCR

A confirmação molecular foi realizada utilizando-se o protocolo descrito por Almeida et al. (2014). Os testes moleculares foram realizados no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – InsPOA da Universidade Federal de Viçosa – MG.

Extração do DNA bacteriano

Para cada uma das estirpes de *Salmonella* isoladas foi utilizado o protocolo para a extração do DNA bacteriano utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (promega, Madison, WI, EUA).

Amplificação do material genético

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram o SIFBF e SIFBR, conforme descrito na Tabela 1, específicos para o gene *sifB* de *Salmonella*, um gene efetor da Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 2 (SPI-2) relacionado a um sistema de Secreção Tipo III (FREEMAN; OHL; MILLER, 2003; MIAO; MILLER, 2000).

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

Gene alvo	Oligonucleotídeo	Sequência	Produto de amplificação
<i>sifB</i>	SIFBF SIFBR	CCAATTACTATCGGGAGAGG GATAGCGAGAGTTGTAACCG	498 pb

Para as reações de PCR foi utilizada uma solução de 25 µL contendo 2 µL da amostra de DNA, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, e 8,5 µL de água livre. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante um minuto para desnaturação inicial, seguidos por 30 ciclos com 94°C/30 segundos (desnaturação), 55°C/30 segundos

(anelamento) e 72°C/1 minuto (extensão). A temperatura de extensão final era de 72°C/1minuto (ALMEIDA; SILVA; NERO, 2014). Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo e um positivo.

Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% posteriormente corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Satain (biotium Inc., EUA) e observado em transluminador UV modelo L-PIX.

Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com padrão de peso molar de 100 bp, sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (Alphaimager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation®) (Figura 3).

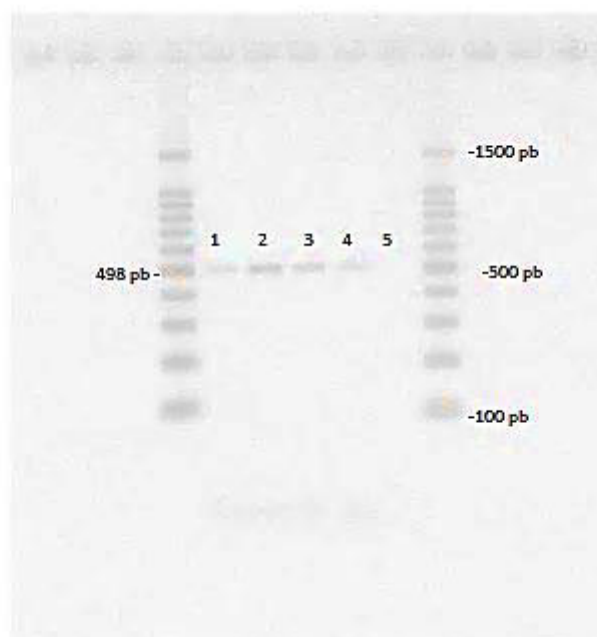


Figura 3. Visualização dos fragmentos amplificados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores SIFBF e SIFBR. 1- Controle positivo: *Salmonella* Enteritidis ATCC CT258. 2- Controle positivo *Salmonella* Braenderup ATCC H9812. 3 e 4 Exemplos de amostras positivas. 5 – Controle negativo: água. Tamanho do produto amplificado (pb): 498.

4.2.6 Análise estatística

Inicialmente a distribuição das variáveis foi analisada e as contagens bacterianas foram convertidas para a escala logarítmica. Modelos de medidas

repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2011) foram usados para comparar cada contagem bacteriana média entre as esteiras e sala de cortes. Um termo de interação entre esteira e momento foi incluído em todos os modelos para testar a hipótese de que a diferença entre esteiras foi dependente do momento analisado. Subsequentemente, a análise foi realizada separadamente para cada sala de corte. Uma estrutura de covariância de simetria composta resultou no melhor ajuste para modelar a correlação entre as medidas repetidas dentro da mesma esteira e sala de corte. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores-P resultantes de comparações múltiplas.

O teste de Qui-quadrado foi utilizado em análise univariada para identificar fatores associados ao isolamento de *Salmonella*. Posteriormente, um modelo de regressão logística (PROC GLIMMIX, SAS Institute, 2011) foi construído para estimar as chances de isolamento de *Salmonella* entre salas de corte, esteiras e momentos. O nível de significância estatística foi definido como 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PESQUISA DE *Salmonella* sp. AO LONGO DO PROCESSO

Os resultados da frequência de *Salmonella* sp. obtidos estão demonstrados de uma maneira geral na Tabela 2. Ao avaliar cada efeito constatou-se que entre as salas de cortes e entre os tempos de coleta houve diferença na frequência do isolamento de *Salmonella* sp. ($P < 0,05$), entretanto não houve diferença na frequência do patógeno isolado ao avaliar o efeito tipo de esteira.

Tabela 2. Análise univariada do isolamento de *Salmonella* sp. em diferentes salas de cortes, diferentes esteiras e diferentes momentos.

Isolamento de <i>Salmonella</i> sp.				
	N	%	Total	P-value*
Sala de cortes				0,0005
1	63	39,38 ^a	160	
2	67	41,88 ^a	160	
3	35	21,88 ^b	160	
4	63	39,38 ^a	160	
Esteira				0,0860
LCA	51	31,88 ^a	160	
LSA	56	35,00 ^a	160	
MCA	51	31,88 ^a	160	
MSA	70	43,75 ^a	160	
Momento				<0,0001
T0	2	1,25 ^b	160	
T1	73	45,63 ^a	160	
T2	74	46,25 ^a	160	
T3	79	49,38 ^a	160	

* Teste qui-quadrado, associado ao Isolamento de *Salmonella* sp. Letras diferentes na mesma coluna, resultados diferem entre si na categoria avaliada ($P < 0,05$). LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água. T0: logo após a higienização pré-operacional. T1: após 4 horas de funcionamento do primeiro turno. T2: após 4 horas de funcionamento do segundo turno. T3: 1 hora antes do término do segundo turno.

Entre as salas de cortes apenas a sala número três diferiu estatisticamente das demais, demonstrando uma frequência de isolamento menor de *Salmonella* sp. Este fato pode estar relacionado com o volume e velocidade de abate, já que dentre os frigoríficos avaliados, este era o que apresentava menor volume de abate diário.

Em relação ao momento avaliado foi possível verificar uma diferença significativa onde a menor taxa de isolamento ocorreu no T0 (logo após a higienização pré-operacional), resultado dentro do esperado, visto que nesse momento a superfície estava recém higienizada e não havia entrado em contato com nenhum tipo de produto.

Em comparação entre as quatro esteiras avaliadas (lisas e modulares, com e sem o uso do protocolo de higienização com aspersão de água), quanto a frequência de isolamento de *Salmonella* sp., não foi possível perceber a diferença estatística entre as mesmas ($P > 0,05$).

A comparação entre esteiras com uso ou não de protocolo de higienização operacional com água sob pressão em esteiras condutoras pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação para *Salmonella* entre as esteiras com e sem o uso de aspersão contínua de água.

Comparação entre Esteiras	OR	Intervalo de confiança 95%	
LCA ^a x LSA ^a	0,84	0,500	1,411
LCA ^b x MSA ^a	0,51	0,307	0,872
LCA ^a x MCA ^a	1,00	0,594	1,684
LSA ^a x MSA ^a	0,61	0,367	1,036
LSA ^a x MCA ^a	1,19	0,708	2,001
MSA ^a x MCA ^b	1,93	1,146	3,254

Letras diferentes na mesma linha significam que os resultados diferem significativamente ($P < 0,05$). LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água.

De acordo com os resultados obtidos ficou evidente que o uso da água não foi a única variável responsável pela ausência ou presença do patógeno, visto que nos resultados obtidos nas esteiras lisas com aspersão de água (LCA) e lisas sem aspersão de água (LSA) não houve diferença significativa (Tabela 3). Porém o mesmo fenômeno não foi observado na esteira do tipo modular, onde houve diferença na chance de isolamento de *Salmonella*, que foi maior na esteira modular em que não era realizado o protocolo de higiene operacional (MSA) quando comparado com a esteira modular em que era realizado o protocolo de higiene operacional com água (MCA). Entre essas duas esteiras foi encontrada uma *Odds Ratio* de 1,93, ou seja, em MSA existia uma chance 1,93 vezes maior de se isolar o patógeno do que na esteira modular com aspersão de água (MCA). Esta diferença

pode estar associada com a estrutura da esteira do tipo modular, que apresenta reentrâncias e sulcos, facilitando a deposição de resíduos. Entretanto quando se compararam as esteira modular com aspersão (MCA) com a esteira lisa com aspersão (LCA) ou então modular sem aspersão (MSA) com a esteira lisa sem aspersão (LSA) não houve diferença na chance de isolamento de *Salmonella*, evidenciando assim que a estrutura da esteira não foi o único fator associado.

Ainda pela Tabela 3 ao se comparar as esteiras MSA x LCA pode-se observar que a chance de isolamento de *Salmonella* na esteira modular em que não se utiliza o protocolo de higienização operacional (MSA) é 1,96 maior do que na esteira lisa em que se utiliza o protocolo de higienização operacional com água (LCA) (OR 0,51). Este resultado pode indicar que houve a interferência dos dois fatores, o uso ou não do protocolo de higienização com aspersão de água e o tipo de esteira envolvida.

As frequências de *Salmonella* sp. em cada sala de cortes separadamente podem ser observadas detalhadamente nas Figuras 4, 5, 6, e 7:

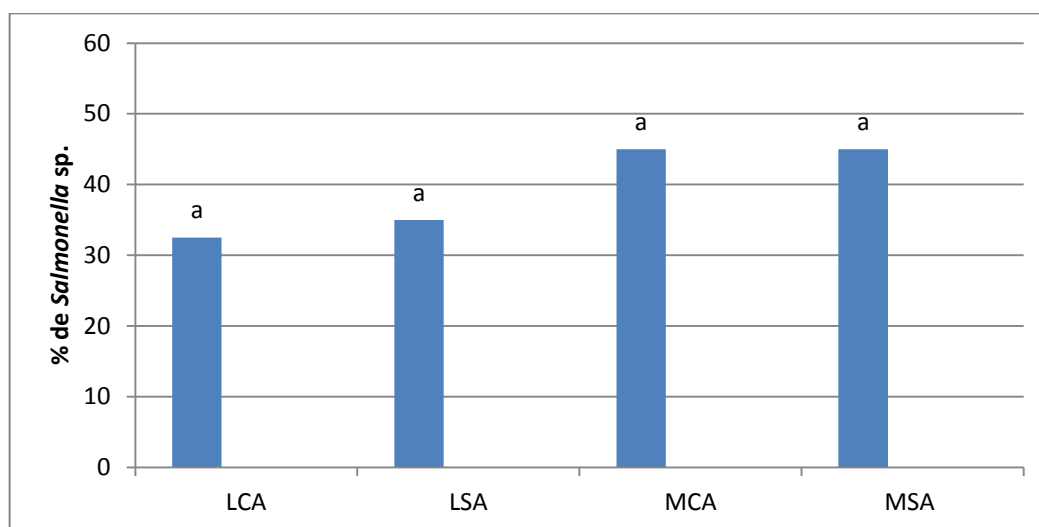


Figura 4. Frequência de *Salmonella* sp. encontrada na sala de cortes 1 de acordo com o tipo de esteira. Letras iguais significam que os resultados não diferem significativamente ($P > 0,05$) LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso de aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água.

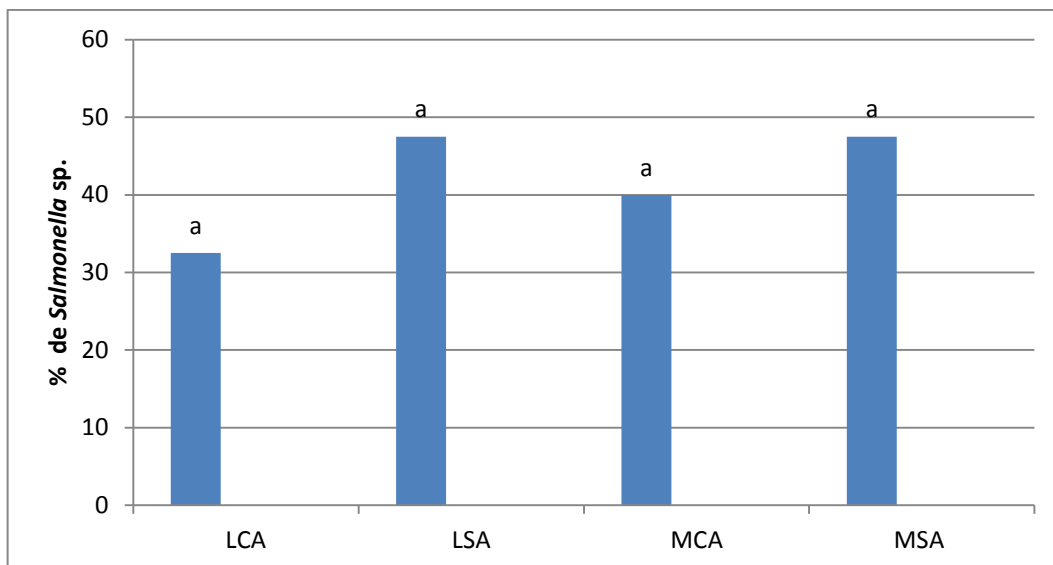


Figura 5. Frequência de *Salmonella* sp. encontrada na sala de cortes 2 de acordo com as esteiras. Letras iguais significam que os resultados não diferem significativamente ($P > 0,05$). LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água.

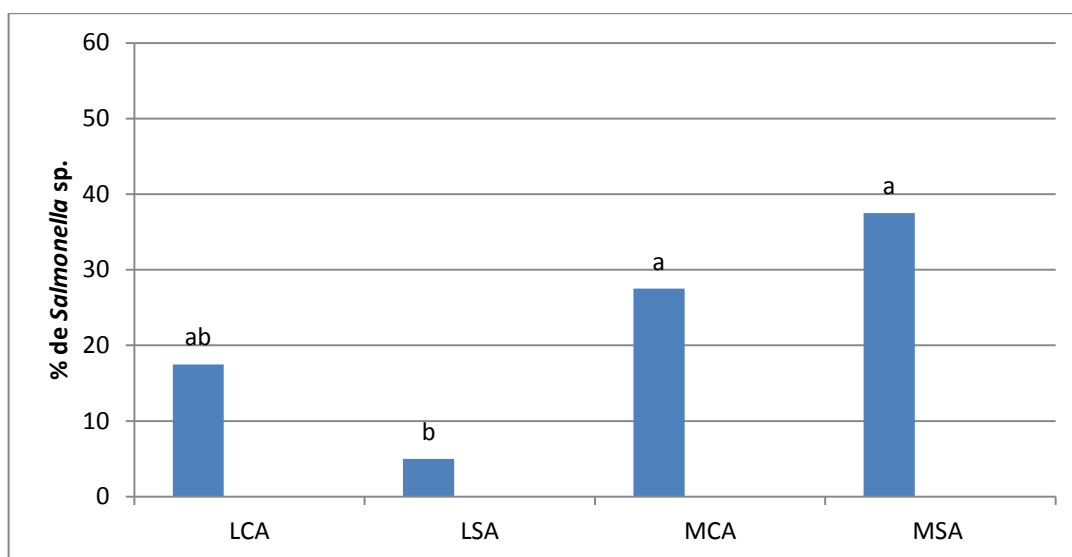


Figura 6. Frequência de *Salmonella* sp. na sala de cortes 3 de acordo com as esteiras. Letras diferentes significam que os resultados diferem entre si ($P < 0,05$). LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água.

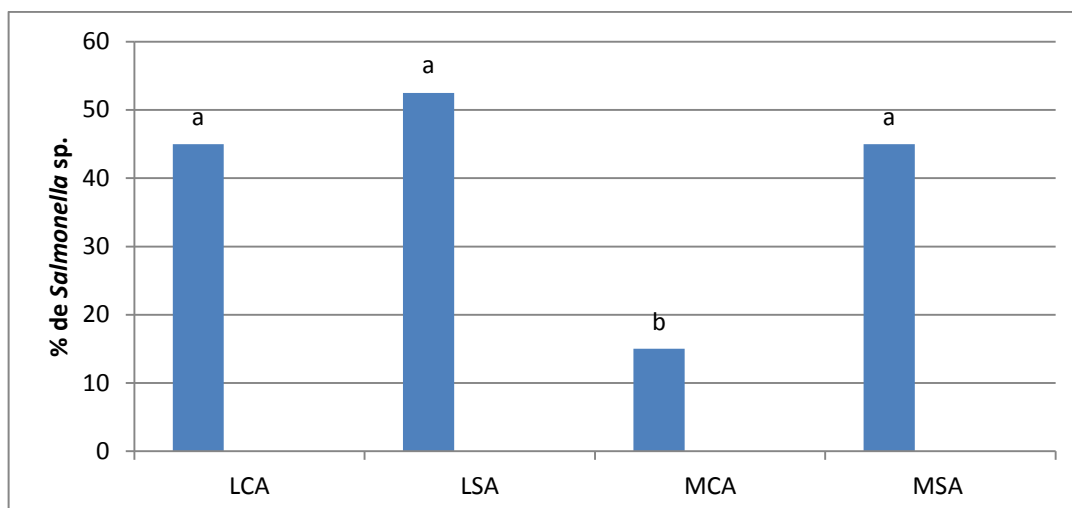


Figura 7. Frequência de *Salmonella* sp. encontrada na sala de cortes 4 de acordo com as esteiras. Letras diferentes significam que os resultados diferem entre si ($P < 0,05$) LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água.

Tratando-se dos isolados obtidos individualmente para cada uma das salas de corte, observou-se que nas salas de corte um e dois não houve diferença significativa entre o uso ou não da aspersão de água, ou entre o modelo da esteira (Figuras 4 e 5).

Na sala de cortes três, como pode se observar na Figura 6, a esteira lisa sem o uso do protocolo de higienização (LSA) apresentou uma frequência menor do patógeno em relação às esteiras modulares (MCA e MSA), porém quando comparada com a esteira do mesmo material em que se usa o protocolo de higienização com aspersão de água (LCA) não foi possível verificar esta diferença indicando que neste caso o uso da água não foi significativo na frequência do patógeno.

Na sala de cortes 4 (Figura 7) a esteira modular com o uso do protocolo da higienização com aspersão de água (MCA) foi a que apresentou menor frequência de *Salmonella* sp. quando comparada com as demais esteiras independente do material utilizado (LCA, LSA e MSA), resultado esse que difere das demais plantas de processamento em que o trabalho foi realizado.

A avaliação da frequência do isolamento de *Salmonella* sp. entre os diferentes momentos ao longo do dia de abate, independente da esteira avaliada, pode ser observada na Tabela 2. O momento denominado T0 (antes do início do

trabalho) foi o que apresentou menor taxa de isolamento do patógeno, em todas as esteiras avaliadas (Tabela 4). Obviamente era um resultado esperado visto que em T0 tratou-se de avaliar as amostras imediatamente colhidas após a higiene pré-operacional.

Tabela 4. Comparação entre a frequência de *Salmonella* sp. (%) durante os momentos de coleta.

Esteira	Momento			
	T0	T1	T2	T3
LCA	0 ^b	45 ^a	47,5 ^a	35 ^a
LSA	2,5 ^b	47,5 ^a	40 ^a	50 ^a
MCA	0 ^b	45 ^a	40 ^a	42,5 ^a
MSA	2,5 ^c	45 ^b	57,5 ^{ba}	70 ^a

Letras diferentes na mesma linha significam que os resultados diferem significativamente ($P < 0,05$). LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água. T0: logo após a higienização pré-operacional. T1: após 4 horas de funcionamento do primeiro turno. T2: após 4 horas de funcionamento do segundo turno. T3: 1 hora antes do término do segundo turno.

Ao avaliar os momentos em cada esteira verifica-se que entre T1, T2 e T3 não houve diferença da frequência de isolamento de *Salmonella* sp., exceto na esteira MSA (Tabela 4). Nesta esteira, e ao se observar a Tabela 5, em T3 a chance de isolamento do patógeno foi 2,86 vezes maior do que no momento T1 (OR 0,35).

Tabela 5. Comparação da razão de chances entre os momentos em cada tipo de esteira separadamente.

Esteira	OR	Intervalo de confiança 95%	
LCA			
T0 – T1	<0,001	<0,001	
T0 - T2	<0,001	<0,001	
T0 –T3	<0,001	<0,001	
T1 – T2	0,90	0,373	2,194
T1 - T3	1,52	0,613	3,764
T2 - T3	1,68	0,679	4,156
LSA			
T0 – T1	0,03	0,003	0,230
T0 - T2	0,04	0,005	0,314
T0 –T3	0,03	0,003	0,208
T1 – T2	1,36	0,556	3,315
T1 - T3	0,91	0,374	2,190
T2 - T3	0,67	0,273	1,628
MCA			
T0 – T1	<0,001	<0,001	
T0 - T2	<0,001	<0,001	
T0 –T3	<0,001	<0,001	
T1 – T2	1,23	0,502	3,003
T1 - T3	1,11	0,454	2,697
T2 - T3	0,90	0,368	2,213
MSA			
T0 – T1	0,03	0,004	0,255
T0 - T2	0,02	0,002	0,154
T0 –T3	0,01	0,001	0,091
T1 – T2	0,61	0,248	1,474
T1 - T3	0,35	0,139	0,886
T2 - T3	0,58	0,229	1,469

Letras diferentes na mesma linha significam que os resultados diferem significativamente ($P < 0,05$). LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água. T0: logo após a higienização pré-operacional. T1: após 4 horas de funcionamento do primeiro turno. T2: após 4 horas de funcionamento do segundo turno. T3: 1 hora antes do término do segundo turno.

5.2 COLIFORMES A 35°C E *Escherichia coli*

Ao se comparar as esteiras em relação ao uso do protocolo de higiene operacional com aspersão de água (Tabela 6), verificou-se que quando foram analisados coliformes a 35°C o uso ou não do protocolo não apresentou diferença entre as esteiras lisas (LCA e LSA) ($P > 0,05$). Indicando que para tal grupo de micro-organismos, neste tipo de esteira (lisa) não houve diferença utilizar ou não o

protocolo de higienização operacional com aspersão de água. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Soares et al. (2014) que constataram que não houve efeito da higiene operacional com aspersão de água na quantificação de enterobactérias em esteiras do mesmo material. Entretanto este padrão não se manteve quando o micro-organismo analisado foi *E.coli*, onde a contaminação da esteira lisa que não utilizou aspersão de água (LSA) foi significativamente maior do que na esteira lisa com aspersão de água (LCA) ($P < 0,05$) evidenciando que o uso do protocolo de higienização neste caso foi eficiente. Contudo, é importante ressaltar que o isolamento da *E. coli* como indicador, compreende um grupo menor de micro-organismos e, desse modo, sua ausência de isolamento pode proporcionar diferenças significativas, mesmo que a superfície possa estar contaminada por outros gêneros mais representativos no tocante a contaminação geral, como os coliformes totais.

Tabela 6. Comparação geral entre as esteiras modulares e lisas, com e sem aspersão de água (Log de UFC/cm²).

Esteiras	Coliformes a 35°C	<i>E. coli</i>
LCA	-0,01 ^b	-0,44 ^b
LSA	0,03 ^{ab}	-0,22 ^a
MCA	-0,14 ^c	-0,47 ^b
MSA	0,11 ^a	-0,20 ^a

Letras diferentes na mesma na mesma coluna: resultados diferem significativamente. ($P < 0,05$). LCA: Esteira lisa com uso de aspersão de água. LSA: Esteira lisa sem o uso aspersão de água. MCA: Esteira modular com o uso de aspersão de água. MSA: Esteira modular sem o uso de aspersão de água.

Em relação ao efeito do uso do protocolo de higienização com aspersão de água para as esteiras modulares isoladamente o uso da água foi significativo, como pode ser observado na Tabela 6, houve diferença entre as esteiras modular com aspersão (MCA) e modular sem aspersão (MSA) para ambos os indicadores estudados, sendo que a contaminação na esteira MCA foi menor do que na MSA em ambas as situações ($P < 0,05$).

Ao se comparar as esteiras em relação ao tipo de material (modular ou lisa) verificou-se que entre as esteiras modulares com aspersão de água (MCA) e lisas com aspersão de água (LCA), a esteira modular com aspersão de água (MCA) teve uma contaminação de coliformes a 35°C menor do que a esteira lisa com aspersão de água (LCA) (Tabela 6). Porém ao se avaliar *E.coli*, nas mesmas duas esteiras (MCA e LCA) não houve diferença entre o tipo de esteira avaliada.

Quando se comparam as esteiras modular sem aspersão de água (MSA) e lisa sem aspersão de água (LSA) observa-se que, tanto para coliformes a 35°C quanto para *E.coli*, não houve diferença significativa quanto ao modelo da esteira (Tabela 6).

Em uma avaliação geral da Tabela 6 é possível verificar que para a análise de coliformes a 35°C, a esteira modular com o uso do protocolo de higienização com aspersão de água (MCA) foi a que apresentou menor contaminação, diferenciando-se das demais. Quanto a contaminação por *E.coli* as esteiras que apresentaram menores níveis foram lisa com aspersão de água (LCA) e modular com aspersão de água (MCA).

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados no trabalho concluiu-se que o uso do protocolo de higienização com aspersão de água foi significativo em algumas situações específicas, dependendo do tipo de esteira avaliado e do grupo ou micro-organismo em questão.

Foi possível concluir que uso de aspersão de água sob pressão como forma de higiene operacional não teve influencia na quantificação de coliformes a 35° quando se avaliou apenas esteiras lisas. Entretanto quando foram avaliadas as esteiras modulares houve redução da quantidade de coliformes a 35°C com o uso de aspersão de água contínua como forma de higiene operacional (MCA). Ao avaliar este grupo de micro-organismo, a esteira MCA destacou-se das demais, pois foi a que apresentou menor taxa de contaminação em relação a qualquer outra.

Para *E.coli*, o efeito do uso de aspersão de água sob pressão foi significativo independentemente do tipo de esteira avaliado (modular ou lisa), constatando nesse caso que o uso da água foi determinante, garantindo uma menor contaminação das esteiras.

Em relação à *Salmonella* sp. pode-se concluir que em esteiras lisas o uso do protocolo de higienização operacional com água sob pressão não foi significativo. Para esteiras modulares houve diferença na chance do isolamento de *Salmonella* sp., sendo que houve maior frequência (e conseqüentemente maior chance de encontrar o patógeno em questão) na esteira em que não foi realizado o protocolo de higiene operacional com água sob pressão.

Com base nos dados encontrados sugere-se que não há um protocolo único que possa ser aplicado em todas as plantas processadoras. Dessa forma avaliando-se criteriosamente cada estabelecimento de acordo com sua realidade de produção pode-se sugerir que quando a indústria consegue controlar os níveis de contaminação, mesmo sem o uso do protocolo de higiene operacional com aspersão de água, este protocolo pode ser eliminado do processo, diminuindo assim a quantidade de água utilizada pela indústria sem causar prejuízos no produto final.

REFERÊNCIAS

- ALALI, W. Q. et al. Prevalence of *Salmonella* in retail chicken meat in Russian Federation. **Journal of food protection**, v. 75, n. 8, p. 1469–73, ago. 2012.
- ALMEIDA, M. V.; SILVA, A.; NERO, L. A. Evaluation of target sequences for the polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in artificially contaminated beef. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 2, p. 111–8, fev. 2014.
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E. et al. International Journal of Food Microbiology Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 281–287, 2012.
- ANDREWS, W. .; HAMMACK, T. *Salmonella*. In: **Bacteriological Analytical Manual**. [s.l.] U.S. Food and Drug Administration, 2007.
- ARTHUR, T. M. et al. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. **Journal of food protection**, v. 67, n. 4, p. 658–665, 2004.
- BARNES, L. M. et al. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4543–8, out. 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria N 210 de 10 de Novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, 1998. Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular N 369 de 2 de junho de 2003. Instruções para elaboração e implantação dos sistemas PPHO e APPCC nos estabelecimentos habilitados à exportação de carnes. **Diário Oficial da União**, 2003. Brasília, DF.
- BRASIL. **Dados epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011**. Disponível em: <portal.saude.gov.br>. Acesso em: 13 nov. 2013.
- BUNCIC, S.; SOFOS, J. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 641–655, mar. 2012.
- CAPITA, R. et al. Occurrence of *salmonellae* in retail chicken carcasses and their products in Spain. **International journal of food microbiology**, v. 81, n. 2, p. 169–73, 15 mar. 2003.
- CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 545–556, mar. 2012.

CARY, J. W.; LINZ, J. E.; BHATNAGAR, D. **Microbial foodborne diseases**. [s.l.] Lancaster, Technomic, 2000. p. 576

CASON, J. A et al. Relationship between aerobic bacteria, *salmonellae* and *Campylobacter* on broiler carcasses. **Poultry science**, v. 76, n. 7, p. 1037–41, jul. 1997.

CASON, J.; HINTON JR, A. Coliforms, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* in a Counterflow Poultry Scalding Tank with a Dip Tank. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 9, p. 846–849, 2006.

CDC. Surveillance for foodborne disease outbreaks--United States, 2009-2010. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 62, n. 3, p. 41–7, jan. 2013.

CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; PELCZAR JR, M. J. Doenças Transmitidas por Água e Alimentos. In: **Microbiologia, conceitos e aplicações**. 2. ed. [s.l.] Makron, 1997.

COSSI, M. V. C. et al. Inspected and non-inspected chilled chicken carcasses commercialized in Viçosa, MG, Brazil: microbiological parameters and *Salmonella* spp. occurrence. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1675–1681, set. 2012.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 342–346, dez. 2002.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual review of microbiology**, v. 49, p. 711–45, jan. 1995.

DONADO-GODOY, P. et al. Prevalence of *Salmonella* on retail broiler chicken meat carcasses in Colombia. **Journal of food protection**, v. 75, n. 6, p. 1134–8, jun. 2012.

DOYLE, M. P.; CLIVER, D. O. *Salmonella*. In: CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne diseases**. San Diego: [s.n.]. p. 185 – 204.

DRUZIANI, J. T. et al. Prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango na região oeste do estado do Paraná e perfil de resistência a antimicrobianos. In: **Livro de resumos / 21. Evento da Iniciação Científica**. Curitiba: Editora UFPR, 2013. p. 513.

DUARTE, D. A. M. et al. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 569–573, set. 2009.

DUNKLEY, K. D. et al. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 15, n. 1-2, p. 26–35, 2009.

EC - EUROPEAN COMMUNITY - COMMISSION REGULATION. Decision 471/2001. **Official Journal of the European Union**, p. 48–53, 8 jun. 2001.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses , Trends and Sources of Zoonoses , Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. **EFSA Journal**, v. 11, n. 4, 2013.

FREEMAN, J. A.; OHL, M. E.; MILLER, S. I. The *Salmonella* enterica serovar typhimurium translocated effectors SseJ and SifB are targeted to the Salmonella-containing vacuole. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 418–27, jan. 2003.

FUZHARA, T. O.; FERNANDES, S. A.; FRANCO, B. D. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of food protection**, v. 63, n. 12, p. 1749–53, dez. 2000.

GHAFFIR, Y. et al. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. **Journal of food protection**, v. 71, n. 1, p. 35–45, jan. 2008.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Symposium series (Society for Applied Microbiology)**, n. 31, p. 98S–110S, jan. 2002.

GOULD, L. H. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1998-2008. **Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)**, v. 62, n. 2, p. 1–34, 28 jun. 2013.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International journal of food microbiology**, v. 130, n. 2, p. 77–87, 31 mar. 2009.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26–9, 2010.

HAEGHEBAERT, S. et al. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. **Bull Epidémiol Hebdo**, n. 50, p. 249–254, 2002.

HEALTH CANADA. MFLP-41 - Environmental sampling for the detection of microorganisms. In: **Compendium of Analytical Methods**. 3. ed. [s.l: s.n.].

HEYDORN, A. et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology (Reading, England)**, v. 146, p. 2395–407, out. 2000.

HUE, O. et al. Prevalence of *Salmonella* spp. on broiler chicken carcasses and risk factors at the slaughterhouse in France in 2008. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1158–1164, ago. 2011.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 819–830, mar. 2012.

HURRELL, E. et al. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 2, p. 227–231, dez. 2009.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microorganismos de los alimentos: Técnicas de análisis microbiológico. In: **Microbiologia dos Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1984. p. 431.

JACKSON, V. et al. The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. **Food Control**, v. 18, n. 4, p. 346–351, maio 2007.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JIMÉNEZ, S. M. et al. Survival of *Salmonella* on refrigerated chicken carcasses and subsequent transfer to cutting board. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 6, p. 687–91, jun. 2009.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International journal of food microbiology**, v. 64, n. 3, p. 367–72, 20 mar. 2001.

KIM, S.-H.; WEI, C. Biofilm formation by multidrug-resistant *Salmonella* enterica serotype typhimurium phage type DT104 and other pathogens. **Journal of food protection**, v. 70, n. 1, p. 22–9, jan. 2007.

KOTTWITZ, L. B. M. et al. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 32, n. 1, p. 9–15, 1 jan. 2010.

L PLYM, F.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 25, n. 2, p. 541–54, ago. 2006.

LUBER, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs - which risks need to be managed first? **International journal of food microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 21–8, 31 ago. 2009.

MATIAS, B. G. et al. *Salmonella* spp. and hygiene indicator microorganisms in chicken carcasses obtained at different processing stages in two slaughterhouses. **Foodborne pathogens and disease**, v. 7, n. 3, p. 313–8, mar. 2010.

MATTICK, K. et al. The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 213–226, 25 ago. 2003.

MEAD, G. et al. Scientific and technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: a global perspective. **Journal of food protection**, v. 73, n. 8, p. 1566–1590, 2010.

MEDEIROS, M. A. N. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 30, n. 6, p. 555–60, dez. 2011.

MIAO, E. A.; MILLER, S. I. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella* typhimurium. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, n. 13, p. 7539–44, 20 jun. 2000.

MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 10, p. 2760–4, out. 1998.

MØRETRØ, T. et al. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 3, p. 1005–12, mar. 2009.

NÓGRÁDY, N. et al. Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe. **International journal of food microbiology**, v. 157, n. 1, p. 108–12, 15 jun. 2012.

NOTERMANS, S.; KAMPELMACHER, E. H. Heat destruction of some bacterial strains attached to broiler skin. **British poultry science**, v. 16, n. 4, p. 351–61, jul. 1975.

OLIVEIRA, M. M. M. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos : uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277–284, 2010.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Evaluaciones de riesgos de Salmonella en huevos y pollos para asar**. 1. ed. Rome: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2005. p. 50

PROUTY, A. M.; GUNN, J. S. Comparative Analysis of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Biofilm Formation on Gallstones and on Glass. v. 71, n. 12, p. 7154–7158, 2003.

REZENDE, C. S. M. et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, n. 555-556, p. 199–203, 2005.

RIBEIRO, A. R. et al. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 296–299, jun. 2007.

RODRIGUES, A. C. A. et al. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1948–1953, out. 2008.

RUBY, J. R.; ZHU, J.; INGHAM, S. C. Using indicator bacteria and *Salmonella* test results from three large-scale beef abattoirs over an 18-month period to evaluate intervention system efficacy and plan carcass testing for *Salmonella*. **Journal of food protection**, v. 70, n. 12, p. 2732–40, dez. 2007.

SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SAKARIDIS, I. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars from chicken carcasses in northern Greece. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 2, p. 203–210, 18 maio 2011.

SERENO, M. J. et al. Prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango na região oeste do estado do Paraná e perfil de resistência a antimicrobianos. In: **Livro de resumos/20. Evento da Iniciação científica**. Curitiba: Editora UFPR, 2012. p. 505.

SOARES, V. M. et al. Transfer of *Salmonella* Enteritidis to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. **Food microbiology**, v. 30, n. 2, p. 453–6, jun. 2012.

SOARES, V. M. et al. Cleaning Conveyor Belts in the Chicken-Cutting Area of a Poultry Processing Plant with 45°C Water. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 3, p. 496–498, 1 mar. 2014.

SOLANO, C. et al. Genetic analysis of *Salmonella* enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 3, p. 793–808, fev. 2002.

STEPANOVIĆ, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in applied microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428–32, jan. 2004.

TESSARI, E. N. C. et al. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2557–2560, 2008.

TIROLI, I. C. C.; COSTA, C. A. DA. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 2, p. 205–208, 2006.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 25, n. 6, p. 807–815, 2003.

TURNER, A K. et al. Identification of *Salmonella* typhimurium genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. **Infection and immunity**, v. 66, n. 5, p. 2099–106, maio 1998.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139–1145, dez. 2006.

WAGNER, V. R.; SILVEIRA, J. B.; TONDO, E. C. Salmonelloses in the State of Rio Grande do Sul, southern Brazil, 2002 to 2004. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 3, p. 723–9, jan. 2013.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675–9, maio 2000.

WELKER, C. A. D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44–48, 2010.

YAMATOIGI, R. S. et al. *Salmonella* spp. in poultry carcass: evaluation of sample preparation methods and effect of storage under refrigeration on pathogen recovery. **Microbiology Research**, v. 3:e12, p. 50–53, 2012.