

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Rastreamento de *Salmonella* no fluxograma de abate de suínos

Marina de Mattos Ferrasso

Pelotas, 2015

Marina de Mattos Ferrasso

Rastreamento de *Samonella* no fluxograma de abate de suínos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Dias Timm

Coorientadora: Profa. Dra. Helenice Gonzalez de Lima

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F369r Ferrasso, Marina de Mattos

Rastreamento de salmonella no fluxograma de abate de suínos / Marina de Mattos Ferrasso ; Cláudio Dias Timm, orientador ; Helenice Gonzalez de Lima, coorientadora. — Pelotas, 2015.

24 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Salmonelose. 2. Saúde pública. 3. Contaminação cruzada. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Lima, Helenice Gonzalez de, coorient. III. Título.

CDD : 636.4

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Marina de Mattos Ferrasso

Rastreamento de *Salmonella* no fluxograma de abate de suínos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/02/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Everton Fagonde da Silva
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Natacha Deboni Cereser
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Profa. Dra. Rita de Cássia dos Santos da Conceição
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

A Deus por iluminar meus caminhos e por ter me abençoado com tantas pessoas maravilhosas.

Ao meu orientador, que proporcionou a oportunidade de realizar o curso de mestrado e mostrou o verdadeiro sentido de orientar.

À minha coorientadora sempre presente com sua paciência e calma.

Aos demais professores do LIPOA e UFPel, que sempre se mostraram prestativos.

À granja e ao estabelecimento e seus funcionários por me acolherem e auxiliarem nas atividades.

Aos meus queridos colegas de trabalho no LIPOA, em principalmente à minha estagiária que esteve comigo durante toda elaboração e execução do trabalho, e também às colegas de pós-graduação com quem dividi inúmeras angústias e felicidades, em especial às que me auxiliaram durante a execução do trabalho.

Aos meus pais, pela vida que me deram, pelo apoio, pelas palavras, pelo carinho, pelo amor e por terem se dedicado e desempenhado seus papéis de forma brilhante, sempre a meu lado.

Aos meus queridos amigos que por muitas vezes precisei me ausentar para que pudesse realizar minhas atividades.

Ao meu namorado por ter estado comigo e apoiado, sempre com muita paciência e amor, assim como sua família.

O meu muito obrigada.

Resumo

FERRASSO, Marina de Mattos. **Rastreamento de *Salmonella* no fluxograma de abate de suínos**. 2015. 24f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O consumo de carne suína *per capita* no Brasil é de 15,1 kg/ano e apesar da sua importância para o consumidor, os produtos suínos, podem ser veículos de patógenos. Uma das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) mais importantes é a salmonelose, doença causada por bactérias do gênero *Salmonella*, geralmente contraída através da ingestão de alimentos de origem animal contaminados. O objetivo do trabalho foi rastrear esse micro-organismo durante o fluxograma de abate de suínos, através da comparação de cepas isoladas em diferentes pontos na linha de produção. Durante o período de estudo, foram acompanhados 10 lotes de suínos encaminhados para abate de uma granja no Rio Grande do Sul. Quatro animais de cada lote selecionado foram acompanhados durante o abate e processamento. Foram coletadas amostras de fezes através da introdução de uma zaragatoa no reto do animal, logo após a insensibilização e em três pontos diferentes do fluxograma, imediatamente após a saída dos animais da depiladeira, após a abertura da cavidade abdominal e momentos antes da carcaça entrar na câmara de refrigeração. Também foi realizada coleta de amostra de papada. Amostras da água utilizada no tanque de escaldagem foram coletadas antes de iniciar o abate de cada lote e após a passagem dos animais. Os isolados foram analisados pela técnica de rep-PCR para comparação dos padrões de bandas. A etapa com maior número de isolados teve origem nas amostras coletadas após a insensibilização 35,3%. Nos demais pontos de coleta, após a saída dos animais da depiladeira, após a evisceração, antes da entrada na câmara de refrigeração e papada, foram isolados 17,6%, 17,6%, 23,5% e 5,8%, respectivamente. Através da análise por rep-PCR, comprovou-se que cepas de *Salmonella* que chegam ao frigorífico em suínos portadores podem não ser eliminadas durante o processamento, sendo possível seu isolamento das carcaças. Também foi observado que cepas introduzidas por animais podem contaminar outros em diferentes etapas do fluxograma de abate, caracterizando contaminação cruzada. Com base nos resultados, recomendam-se cuidados rigorosos na execução de medidas higiênico-sanitárias adotadas durante o abate, de forma a garantir um alimento seguro ao consumidor.

Palavras-chave: salmonelose; saúde pública; contaminação cruzada

Abstract

FERRASSO, Marina de Mattos. **Screening *Salmonella* in pork slaughtering flowchart.** 2015. 24f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Pork consumption per capita in Brazil is 15.1kg/year and despite its importance for the consumer pork products may be pathogens vehicles. Salmonellosis is one of the most important foodborne diseases, and it is caused by bacteria of the genus *Salmonella*, often contracted through the ingestion of contaminated animal products. The objective was to trace this microorganism during the pig slaughter flowchart, by comparing strains isolated at different points on the production line during the study period, were followed 10 lots of pigs from a farm in Rio Grande do Sul sent to slaughter, five lots carriers of *Salmonella* and five non-carriers. Four animals from each selected lot were followed during slaughter and processing. Stool samples were collected at slaughter and in three different parts of the flowchart, immediately after the animals left from scrap machine, after opening the abdominal cavity and just before the carcass enter the cooling chamber. It was also collected jowl samples. Water samples used in the scalding tank were collected before starting the slaughter process of each lot and after the passage of the animals. The isolates were analyzed by rep-PCR to compare the band patterns. The step with the highest number of isolates originated in the samples collected after stunning 35.3%. In other collection sites, immediately after the animals left from scrap machine, after evisceration, before entering the cooling chamber and jowls were isolated 17.6%, 17.6%, 23.5% and 5.8%, respectively. Through analysis by rep-PCR, it was found that *Salmonella* strains that reach the fridge in pigs carriers can not be deleted during processing, it is possible isolation of carcasses. It was also observed that animals introduced by strains can infect others in different stages of slaughtering flowchart, featuring cross-contamination. Based on the results, are recommended strict care in the execution of hygiene and sanitary measures taken during slaughter in order to ensure safe food to consumers.

Key-words: salmonellosis; public health; cross-contamination

Lista de Tabelas

Tabela 1	Presença de <i>Salmonella</i> na granja e no fluxograma de abate de suínos.....	15
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
ABIEPCS	Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
g	Gramas
HCl	Ácido Clorídrico
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
V	Volume

Sumário

1 Introdução.....	9
2 Material e Métodos.....	12
2.1 Coleta das Amostras	12
2.2 Obtenção dos Isolados	13
2.3 Extração de DNA.....	13
2.4 Perfis Moleculares.....	13
3. Resultados e Discussão.....	15
4 Considerações Finais.....	20
Referências.....	21

1 Introdução

Segundo a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIPÉCS), o setor da carne suína no Brasil, em 2012, chegou ao número de 39,5 mil produtores, que produziram 3,49 milhões de toneladas de produtos suínos, das quais exportou 2.907 toneladas, constituindo uma parcela significativa da economia do país. O consumo de carne suína *per capita* no Brasil é de 15,1kg/ano, sendo os produtos frescos (linguiças) e pratos prontos as preferências dos consumidores (ABIPÉCS, 2012). Os produtos suínos, apesar da sua importância para o consumidor, podem ser veículos de patógenos (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por um agente infeccioso específico ou por toxinas por ele produzidas (BRASIL, 2001). A contaminação dos alimentos por agentes microbiológicos é uma preocupação mundial de saúde pública. A maioria dos países tem documentado aumentos significativos ao longo das últimas décadas em relação à incidência de doenças causadas por micro-organismos nos alimentos (WHO, 2014). Uma das DTA mais importantes é a salmonelose, doença causada por bactérias do gênero *Salmonella*, geralmente contraída através da ingestão de alimentos de origem animal contaminados (como ovos, carne e leite) (WHO, 2013; CDC, 2012).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram-negativos não produtores de esporos (HAMMACK, 2012), anaeróbios facultativos, que produzem gás a partir de glicose, sendo a maioria móvel através de flagelos peritríquios (FRANCO & LANDGRAF, 2003). A espécie *S. enterica* é a que mais preocupa em saúde pública por ser capaz de causar doença em seres humanos (HAMMACK, 2012). *S. enterica* está dividida em seis subespécies e subdividida em sorotipos, que são diferenciados por seus antígenos de superfície (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (CAMPOS, 2005). A salmonelose é caracterizada por apresentação aguda com febre, dor abdominal, diarreia, náuseas e por vezes vômito. O aparecimento dos sintomas pode variar de 6 a 72 horas

(geralmente 12-36) após a ingestão do alimento contaminado e a doença dura de 2 a 7 dias (WHO, 2013). Em alguns pacientes, a diarreia pode ser severa o suficiente para levar à hospitalização (CDC, 2012). A salmonelose é uma das DTA mais comuns e amplamente distribuídas ao redor do mundo (WHO, 2013). Nos Estados Unidos são reportados aproximadamente um milhão de casos por ano, com 19.000 hospitalizações e 380 mortes (CDC, 2012). No Brasil, a ANVISA registrou 749 casos de salmonelose dos anos de 1999 a 2004 (BRASIL, 2004).

Ao analisar 23 surtos de DTA causados por *Salmonella* no noroeste do estado de São Paulo, Peresi et al. (1998) mostraram que dois foram ocasionados por produtos de origem suína, um por salsicha em um asilo de idosos em que necessitou a hospitalização de 93,3% dos afetados e o outro possivelmente causado pela ingestão de patê de mortadela que teve 39,5% de internações. Já Landgraf, Gonçalves e Falcão (1983), apresentaram dados de um surto de toxinfecção alimentar na cidade de Araraquara, São Paulo, Brasil, originado de um restaurante industrial, em que foi isolada *Salmonella* de todos os acometidos. Dos alimentos avaliados, foi isolada *Salmonella* apenas de linguiça frescal.

Vários estudos têm isolado *Salmonella* de produtos suínos. Por exemplo, Cabral et al. (2014) avaliaram 51 amostras de linguiça frescal suína de cidades litorâneas Rio de Janeiro, Brasil, e isolaram *Salmonella* de 29% (15/51) das amostras. Mürmann, Santos e Cardoso (2009) avaliaram 336 amostras de linguiça frescal suína em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil e obtiveram 82 isolados (24,4%). Esses achados demonstram potencial perigo à saúde do consumidor, tendo em vista que a linguiça frescal suína é um produto amplamente consumido.

Um estudo realizado por Versalovic et al. (1991) demonstrou que a sequência de rep (sequência repetitiva palindrômica extragênica) está presente em muitas espécies bacterianas, incluindo *Salmonella*, e que pode ser utilizada para produzir *fingerprint* de diferentes genomas, dessa forma podendo-se realizar a comparação entre o genoma dos isolados.

A qualidade microbiológica dos produtos derivados de suínos deve ser avaliada, tendo em vista que são uma importante forma de veiculação de DTA. O estudo da disseminação de *Salmonella* ao longo da cadeia produtiva de suínos é importante para avaliar se a contaminação presente na granja se mantém ao longo da linha de abate e processamento da carne suína. Também permite avaliar a

origem desse micro-organismo, estabelecendo se a contaminação dos produtos suínos é proveniente da granja ou de contaminação cruzada na indústria frigorífica, através de utensílios e equipamentos, ou através de contaminação por outros animais ou humanos que sejam portadores.

Alguns autores, como Colla et al. (2014), Arguello et al. (2011) e Bonardi et al. (2013) isolaram *Salmonella* em carcaças suínas antes dessas passarem pela etapa de refrigeração no abatedouro-frigorífico, provando ser possível encontrar *Salmonella* em diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos. A identificação de clones de *S. enterica* em distintas etapas do processamento dos suínos constitui importante informação para a compreensão das formas de disseminação dos agentes etiológicos dentro da planta frigorífica e para a elaboração de medidas de controle da contaminação dos alimentos oferecidos ao consumidor. A reação em cadeia da polimerase de elementos repetitivos (rep-PCR) pode ser gerada pela determinação da presença de sequências repetidas que estão distribuídas no genoma através da PCR do politrinucleotídeo (GTG)₅, de forma a compor um perfil molecular, que tem sido usado com sucesso na diferenciação de cepas de *S. enterica* (RASSCHAERT et al., 2005).

Considerando a hipótese de que animais portadores de *Salmonella* podem manter o micro-organismo até o produto final e também ser fonte de contaminação cruzada dentro do estabelecimento, o objetivo do trabalho foi rastrear esse micro-organismo durante o fluxograma de abate de suínos, através da comparação de cepas isoladas em diferentes pontos na linha de produção.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta das amostras

Durante o período de estudo, foram acompanhados 10 lotes de suínos de uma granja de ciclo completo no Rio Grande do Sul encaminhados para abate. Os lotes foram selecionados mediante análise para pesquisa da presença de *Salmonella* em amostras de fezes, duas semanas antes da data de abate. As amostras foram coletadas caminhando em diferentes direções no interior das baias utilizando propés descartáveis. Após, uma zaragatoa foi friccionada no propé, a fim de obter as amostras. Imediatamente após a coleta de três amostras por baia, o material foi encaminhado ao laboratório em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia) em caixas isotérmicas com gelo.

Quatro animais de cada lote selecionado foram acompanhados durante o abate e processamento em frigorífico legalmente estabelecido, cadastrado e inspecionado pela Coordenadoria de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Agronegócio do estado do Rio Grande do Sul. Foram coletadas amostras de fezes no momento do abate, através da introdução de uma zaragatoa no reto do animal logo após a insensibilização e em três pontos diferentes do fluxograma, imediatamente após a saída dos animais da depiladeira, após a abertura da cavidade abdominal e momentos antes da carcaça entrar na câmara de refrigeração. Também foi realizada coleta de amostra de papada desses mesmos animais. As amostras foram coletadas através da fricção de zaragatoas em uma área de 100cm² delimitada através de gabarito de aço inoxidável esterilizado na superfície da pele (saída da depiladeira e na entrada da câmara de refrigeração), na superfície interna da carcaça (abertura da cavidade abdominal) e na papada. Também foram coletadas amostras da água utilizada no tanque de escaldagem, antes de iniciar o abate de cada lote e após a passagem dos animais, em frascos de vidro esterilizados, em quantidade aproximada de 30mL

2.2 Obtenção dos isolados

Para pesquisa de *Salmonella*, as zaragoas foram colocadas em tubos de ensaio com 10mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia). O material foi incubado para pré-enriquecimento e demais procedimentos para pesquisa de *Salmonella*, conforme recomendado por U.S. Food and Drug Administration – FDA (ANDREWS et al., 2014). Culturas dos isolados em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) foram misturadas com 20% de glicerol, para manutenção de estoque a -20°C, e recuperadas quando necessário.

Uma zaragoa foi umedecida em cada amostra de água do tanque de escaldagem e as análises foram procedidas conforme descrito.

2.3 Extração de DNA

O DNA dos isolados foi extraído conforme Sambrook e Russel (2001). Resumidamente, o *pellet* obtido por centrifugação de 1mL de cultura em BHI foi ressuspenso em 100µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2M, NaCl 0,5M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01M, pH 7,6]. Foram adicionados 50µL de pérolas de vidro e 100µL de fenol-clorofórmio. Após homogeneização por 1min, a mistura foi centrifugada a 13.000g por 5min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5M a -70°C por 30min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000g por 20min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH7,4), foi adicionado 1µL de RNase (10µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -20 °C.

2.4 Perfis moleculares

Os perfis moleculares dos isolados foram determinados por rep-PCR, segundo Rasschaert et al. (2005) com modificações, utilizando o primer (GTG)₅ (GTGGTGGTGGTGGTG), conforme Versalovic (1994). Resumidamente, as condições da rep-PCR foram as seguintes: 2,5µL de DNA, 2µL do oligonucleotídeo 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3', 12,5µL de Master Mix (Qiagen, Alemanha) e 8µL de água para completar o volume da reação. Os ciclos da amplificação foram efetuados

da seguinte forma: 1 ciclo de 94°C por 5min, 30 ciclos subsequentes de 95°C por 30s, 45°C por 1min e 60°C por 5min, e finalmente 1 ciclo de 60°C por 16min. Para a visualização dos padrões de banda das diferentes regiões amplificadas no genoma, os produtos da PCR foram corados com GelRed e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 2%.

Os padrões da rep-PCR foram interpretados de acordo com os critérios sugeridos por Tenover et al. (1995), utilizando a classificação em quatro formas: indistinguíveis (nenhuma banda diferente), intimamente relacionadas (2-3 bandas distintas), possivelmente relacionadas (4-6 bandas distintas) e diferentes (mais de 7 bandas distintas).

3 Resultados e Discussão

Dos 17 isolados obtidos no estudo durante o fluxograma de abate, o maior percentual (35,3%) teve origem nas amostras coletadas após a insensibilização, através da introdução da zaragatoa no reto do animal. Ao se analisar os resultados observa-se que nem todos os animais de um lote positivo para *Salmonella* são portadores do micro-organismo. Por outro lado, a presença de animais portadores em lotes considerados negativos significa que, embora o método de coleta das amostras nas baias tenha sido realizado de maneira a ser o mais representativo possível, o resultado dos lotes não deve ser aplicado aos animais individualmente (Tabela 1).

Tabela 1. Presença de *Salmonella* na granja e no fluxograma de abate de suínos.

Lotes	Água Inicial	Reto ^a	Após Depiladeira	Após Evisceração	Entrada da Câmara	Papada	Água Final
Positivos ^b							
1	-	--+-	---+	+---	+---	----	-
2	-	+---	--+-	----	----	---+	-
3	-	----	----	----	----	----	-
4	-	----	----	----	----	----	-
Negativos							
1	-	-+--	---+	--+-	----	----	-
2	-	----	----	----	---+	----	-
3	-	----	----	----	---+	----	-
4	-	----	----	----	----	----	-
5	-	-+--	----	----	----	----	-
6	-	--++	----	--+-	---+	----	-

^aNas colunas onde aparecem quatro símbolos (+ ou -), cada um corresponde a um suíno. A ordem dos animais é a mesma em toda linha. Ausência de *Salmonella* (-); presença de *Salmonella* (+).

^bPositivos: lotes com presença de *Salmonella* nas amostras de fezes obtidas nas baias; Negativos: lotes com ausência de *Salmonella* nestas amostras.

Nos demais pontos de coleta, após a saída dos animais da depiladeira, após a evisceração, antes da entrada na câmara de refrigeração e papada, foram obtidos 17,6%, 17,6%, 23,5% e 5,8%, respectivamente. Em um estudo na Bélgica, Busser et al. (2011) acompanharam 226 suínos durante o abate, e obtiveram isolados de *Salmonella* em pelo menos um ponto de coleta do fluxograma de 109 animais (48,2%), enquanto no nosso trabalho, das 220 amostras coletadas, foram obtidos 17 isolados (7,7%), sendo que foram isolados de 14 animais diferentes. Esse menor número possivelmente esteja relacionado às diferenças nas condições higiênico-sanitárias dos abatedouros e no rigor na aplicação e inspeção dos programas de autocontrole.

Não foram obtidos isolados a partir da água do tanque de escaldagem. Não é de se esperar que *Salmonella* permaneça viável na água do tanque de escaldagem. Ao avaliar água do tanque de escaldagem em dois abatedouros na Holanda Swanenburg et al. (2001) obtiveram dois isolados em um dos estabelecimentos e Piras et al. (2011) obtiveram um isolado em um trabalho realizado em Sardenha, Itália, em que avaliaram a água do tanque de escaldagem de cinco abatedouros. Já em outros estudos em que também foi analisada (PEARCE et al., 2004; BUSSER et al., 2011; BONARDI et al., 2013), o micro-organismo não foi isolado. Segundo Roberts et al. (2005) a temperatura da água do tanque de escaldagem deve ser superior a 60°C para evitar a contaminação da carcaça. A legislação brasileira exige que a água do tanque de escaldagem esteja de 62°C a 72°C (BRASIL, 1995).

Foram obtidos três (17,64%) isolados após a saída dos animais da depiladeira, percentual mais elevado em relação a um estudo realizado por Hernandez et al. (2013) na Espanha, no qual foi obtido um isolado a partir de 80 amostras analisadas. A presença de *Salmonella* nas carcaças após a escaldagem pode ser devida ao fato de não ter sido respeitado o tempo ou a temperatura durante essa etapa, quando a carcaça deve permanecer no tanque de escaldagem por dois a cinco minutos (BRASIL, 1995). Outra possibilidade é a presença de sujidades na superfície da pele, que serviria de proteção para *Salmonella* durante a imersão na água com temperaturas elevadas.

Salmonella foi isolada de três das 17 (17,6%) amostras obtidas após a evisceração, uma etapa com alto risco de contaminação fecal. Entretanto, em outro estudo realizado no Brasil, em Minas Gerais, por Ducas e Silva (2011), nenhum resultado positivo para esse micro-organismo foi encontrado em 18 amostras de

carcaças coletadas após a evisceração em um abatedouro-frigorífico de Inspeção Federal. Por outro lado, Pearce et al. (2004), na Europa obtiveram 7% de isolados nessa mesma etapa. As condições dos estabelecimentos e treinamento de funcionários podem ter sido determinantes para tais resultados, tendo em vista que a etapa de evisceração é muito delicada, pois há grande manipulação das vísceras pelo operador.

Das amostras de papada foram obtidos 5,8% do total de isolados do estudo. Esse resultado tem um significado importante, uma vez que a papada é utilizada como matéria-prima para a produção de embutidos, os quais têm sido reportados como possíveis transmissores de *Salmonella* para humanos (Cabral et al., 2014; Mürmann, Santos e Cardoso, 2009).

Em nosso trabalho 23,5% dos isolados foram obtidos a partir da carcaça antes de entrar para a refrigeração. Vários estudos têm sido realizados avaliando a presença de *Salmonella* em carcaças prontas para a refrigeração, apresentando resultados diversos. Em um estudo desenvolvido por Colla et al. (2014) no Rio Grande do Sul, os autores tiveram 32,5% (39/120) das amostras de carcaças com presença de *Salmonella*. Arguello et al. (2011) isolaram *Salmonella* de 39,7% (356/896) de carcaças avaliadas antes de passarem para a etapa de refrigeração, na Espanha. Em um estudo na Itália, Bonardi et al. (2013) isolaram *Salmonella* em 10,9% (49/451) das amostras de carcaças analisadas. Já Bonardi et al. (2003), em outro trabalho, também na Itália, obtiveram 6% (9/150) de isolados e Ducas e Silva (2011), em Minas Gerais, não obtiveram isolados em 18 carcaças. Esses distintos resultados provavelmente se devam às diferentes condições higiênico-sanitárias adotadas nos abatedouros em que foram realizados os estudos e à maior ou menor prevalência do micro-organismo nas granjas de onde os suínos eram provenientes.

Os isolados foram analisados pela técnica de rep-PCR para, através da comparação dos padrões de bandas, avaliar a persistência das cepas no decorrer do fluxograma e identificar contaminações cruzadas.

Ao ser realizado o acompanhamento dos animais provenientes dos lotes positivos, foi possível verificar que no lote 1 o isolado da granja, foi indistinguível quando comparado aos que foram obtidos a partir do reto dos animais 3 e 4. Da mesma forma no lote 2 o isolado da granja foi indistinguível ao isolado do reto do animal 3, e no lote 3 o isolado da granja foi classificado como intimamente relacionado ao isolado obtido no momento do abate do animal 1 e indistinguível do

isolado do animal 4. Esses achados mostram que os animais estavam contaminados com a mesma cepa isolada das amostras do lote em que se encontravam na granja. Já no lotes 4 não foram obtidos isolados durante o fluxograma de abate, indicando que esses animais, embora oriundos de um lote positivo para *Salmonella*, não albergavam o micro-organismo e não sofreram contaminação cruzada com os demais suínos do lote.

Ao monitorar-se o lote 2, houve isolamento nos animais 1, 3 e 4. No animal 1 isolou-se após a saída da depiladeira, após evisceração e antes da entrada da câmara de refrigeração. No animal 3 o isolado foi obtido apenas no reto do animal e não foram obtidos isolados no restante das etapas, o que sugere que as medidas higiênico-sanitárias foram eficazes. Todos os isolados do animal 1 quando comparados puderam ser classificados como indistinguíveis entre si. Todos os isolados, dos diferentes animais desse lote, foram classificados como indistinguíveis quando comparados entre si. Através desses resultados, percebe-se que a contaminação que permaneceu durante o abate era proveniente da granja.

O lote 3 apresentou isolados em três animais acompanhados durante o abate em pelo menos um dos pontos avaliados. Como não foi obtido nenhum outro isolado a partir do animal 1, apenas de seu reto, acredita-se que as medidas higiênicas executadas tenham sido suficientes para evitar a contaminação. O isolado do animal 3 foi considerado intimamente relacionado ao isolado da granja. Esses dois animais não eram portadores de *Salmonella*, mas foram contaminados pela mesma cepa encontrada na granja e nos outros dois animais desse lote que foram acompanhados. Com esses dados, observa-se que não só a contaminação pode permanecer durante o abate, mas que também houve contaminação cruzada durante o processamento.

Ao acompanhar os animais dos lotes que foram negativos para *Salmonella* na granja, foi observado que durante o abate do lote 1 o isolado do reto do animal 2 e o obtido após a evisceração do animal 3 foram classificados como indistinguíveis e o isolado obtido após a saída da depiladeira do animal 4 foi classificado como intimamente relacionado a eles. Como não houve isolamento na granja e houve da amostra do reto de um dos animais, o que também ocorreu no lote 3 e 5, é possível que as fezes desse animal não tenham feito parte do material amostrado na baia do lote ou ele pode ter sido contaminado na granja após a coleta realizada para o estudo. A igualdade e/ou semelhança entre os isolados dos animais em diferentes

etapas, sugere contaminação cruzada no abatedouro, através de utensílios, contato com outras carcaças ou manipuladores, tendo em vista que esses animais passaram pelas etapas após o animal 2.

Durante o monitoramento do lote 2 obteve-se apenas um isolado durante o abate, antes da entrada para a câmara de refrigeração, como não houve isolamento nas demais etapas, acredita-se que possa ter ocorrido a contaminação da carcaça durante o fluxograma, pois esse isolado foi obtido ao final da linha de abate tendo sofrido intensa manipulação.

No lote 3, foi obtido um isolado a partir do animal 4 antes da entrada câmara de refrigeração, os quais foram classificados como indistinguíveis entre si. Como os animais faziam parte de lote negativo na granja e todos chegaram negativos ao abate, acredita-se que tenha ocorrido contaminação durante as etapas do fluxograma de abate.

O isolado do lote 5, foi obtido do reto do animal 2 e em nenhuma das etapas seguintes. Nesse caso, as medidas higiênico-sanitárias do estabelecimento foram eficazes para evitar a contaminação de carcaças.

No lote 6, do qual dois animais chegaram ao abate portando *Salmonella* e a bactéria foi isolada em etapas subsequentes do fluxograma de abate, todos os isolados foram classificados como indistinguíveis, o que demonstra que a contaminação permaneceu durante o processamento. A partir das informações obtidas nesse lote, é possível verificar que a contaminação que chega ao estabelecimento através de animais portadores pode permanecer durante o fluxograma de abate se as medidas higiênico-sanitárias não forem suficientes para a eliminação da bactéria.

4 Considerações Finais

Por meio desse trabalho, comprova-se que cepas de *Salmonella* que chegam ao frigorífico em suínos portadores podem não ser eliminadas durante o processamento, sendo possível seu isolamento das carcaças e que a cepa presente na granja também é isolada no abatedouro. Também comprova-se que cepas introduzidas por animais podem contaminar outros em diferentes etapas do fluxograma de abate, caracterizando contaminação cruzada. Dessa forma, recomendam-se cuidados rigorosos na execução de medidas higiênico-sanitárias adotadas durante o abate, de forma a garantir um alimento seguro ao consumidor.

Referências

ABIPECS, 2012 - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. ABIPECS 2012/2013. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf>. Acesso em: 13 out. 2013.

ANDREWS, W.H.; ANDREW, J.; HAMMACK, T. Chapter 5 *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual online**. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 23 set. 2014.

ARGUELLO, H.; CARVAJAL, A.; COLLAZOS, J. A.; GARCÍA-FELIZ, C.; RUBIO, P. Prevalence and serovars of *Salmonella* enterica on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. **Food Research International**. v. 45, p. 905–912, 2012.

BONARDI, S.; BASSI, L.; BRINDANI, F.; D'INCAU, M.; BARCO, L.; CARRA, E.; PONGOLINI, S. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**. v. 163, p. 248–257, 2013.

BONARDI, S.; BRINDANI, F.; PIZZINA, G.; LUCIDIA, L.; D'INCAUB, M.; LIEBANAC, E.; MORABITOD, S. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**. v. 85, p. 101–110, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução-RDC nº12, de 02/01/01, **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção I, p. 45-53.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. **Hábitos de higiene são fundamentais no controle da *Salmonella***. Brasília, 17 de setembro de 2004 - 11h30. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2004/170904.htm>> Acesso em: 17 de jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília. Normas técnicas de instalações e equipamentos para abate industrialização de suínos. Instalações e equipamentos relacionados com a técnica da inspeção “ante-mortem” e “post-mortem”. **Portaria Nº 711** de 1º de novembro de 1995.

BUSSER, E.V. DE; MAES, D.; HOUF, K.; DEWULF, J.; IMBERECHTS, H.; BERTRAND, S.; ZUTTER, L. DE. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**. v. 145, p. 279–286, 2011.

CABRAL, C. C.; CONTE-JUNIOR, C. A.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. *Salmonella* spp. contamination in fresh pork and chicken sausages marketed in Niterói and Rio de Janeiro, Brazil. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**. v. 9, p. 243–249, 2014.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. p. 318-328.

CDC. Content source: National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). Page last reviewed: September 27, 2010. Page last updated: April 5, 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>
Acesso em: 03 dez. 2014.

COLLA, F. L.; MION, L.; PARIZOTTO, L.; SANTOS, L.A.; PILOTTO, F.; RODRIGUES, L.B.; NASCIMENTO, V.P.; SANTOS, L.R. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e eficácia de sanitizantes frente aos isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças suínas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34, n. 4, p. 320-324, 2014.

DUCAS, C. T. S.; SILVA, L. F. Pesquisa de *Salmonella* spp. e enumeração de coliformes totais e termotolerantes em carcaça de suínos abatidos em matadouro-frigorífico de Uberlândia, Minas Gerais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.17. n.1, p. 54-61, jan./jun. 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Atheneu. 2003. p. 33-81.

HAMMACK, T. *Salmonella* species. In: LAMPEL, K. A.; AL-KHALDI, S.; CAHILL, S. M. **Bad Bug Book Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**. 2. ed. 2012.

HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-LAGUNA, J.; LUQUE, I.; HERRERA-LEÓN, S.; MALDONADO, A.; REGUILLO, L.; ASTORGA, R. J. *Salmonella* prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: Tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering. **International Journal of Food Microbiology**. v. 162, p. 48–54, 2013.

LANDGRAF, M.; GONÇALVES, J. A.; FALCÃO, D. P. Surto de Toxinfecção Alimentar por *Salmonella bredeney*. Notas Epidemiológicas. **Revista Saúde Pública**. São Paulo, v. 19, p. 92-93, 1985.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C. dos; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**. v. 20, p. 191–195, 2009.

PEARCE, R. A.; BOLTON, D. J.; SHERIDAN, J. J.; MCDOWELL, D. A.; BLAIR, I. S.; HARRINGTON, D. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. **International Journal of Food Microbiology**. v. 90, p. 331–339, 2004.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A Z. C.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. F.; RODRIGUES, E. C. A.; FERNANDES, S. A.; GELLI, D. S.; IRINO, K. Enfermidades transmitidas por *Salmonella* Enteritidis. **Revista Saúde Pública**. v. 32 n. 5, p. 477-483, 1998.

PIRAS, F.; BROWN, D. J.; MELONI, D.; MUREDDU, A.; MAZZETTE, R. Investigation of *Salmonella enterica* in Sardinian slaughter pigs: Prevalence, serotype and genotype characterization. **International Journal of Food Microbiology**. v. 151, p. 201–209, 2011.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRICKX, M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3615–3623, 2005.

ROBERTS, T. A., PITT, J. I.; FARKAS, J.; GRAU, F.H. (Eds) Microbial Ecology of Food Commodities. In: **Microorganisms in Foods**. Volume 6. Blackie Academic & Professional; Chapter 1 Meat and Meat products. p. 1-88. Estados Unidos, Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=Yy_oBodctolC&pg=PA25&lpg=PA25&dq=Sni+jders+1976&source=bl&ots=Kc93VDhFs9&sig=uMDTYaCJKPerD5-zWcCIFr9g3CE&hl=pt-BR&sa=X&ei=QjHBVPXkNOuwsASQ9oDgDg&ved=0CEIQ6AEwBg#v=onepage&q&f=false Acesso em: 22 jan. 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A.; KEUZENKAMP, D. A.; KNAPEN, F. van. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**. v. 70, p. 243–254, 2001.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing . **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, n. 9, p. 2233–2239, 1995.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823–6831, 1991.

VERSALOVIC. J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequencebased polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25–40, 1994.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. In: Food Safety, **Microbiological risks**. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/microbiological-risks/en/> Acesso em: 23 set. 2014.

_____. WORLD HEALTH ORGANIZATION. In: Media Centre. **Salmonella**. Fact sheet N°139. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>> Acesso em: 28 out. 2013.