

Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte¹

Lilian Andriava dos Santos², Ligiani Mion³, Marcieli Marotzki⁴, Luana Parizotto⁵,
Laura Beatriz Rodrigues⁶, Vladimir Pinheiro do Nascimento⁷
e Luciana Ruschel dos Santos^{6*}

ABSTRACT.- Santos L.A., Mion L., Marotzki M., Parizotto L., Rodrigues L.B., Nascimento V.P. & Santos L.R. 2015. [Miniaturized most probable number and conventional microbiology for isolation of *Salmonella* spp. in poultry slaughterhouses.] Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(3):223-229. Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, BR-285, Bairro São José, Passo Fundo, RS 99052-900, Brazil. E-mail: luruschel@upf.br

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

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

¹ Recebido em 28 de julho de 2014.

Aceito para publicação em 30 de dezembro de 2014.

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

³ Graduanda do Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária-UPF, BR-285, Bairro São José, Passo Fundo, RS 99052-900.

⁴ Graduanda do Curso de Medicina Veterinária, FAMV-UPF, Passo Fundo, RS 99052-900. Bolsista PIBIC UPF.

⁵ Graduanda do Curso de Medicina Veterinária, FAMV-UPF, Passo Fundo, RS 99052-900. Bolsista PIBIC CNPq.

⁶ Curso de Medicina Veterinária, FAMV-UPF, Passo Fundo, RS 99052-900. *Autor para correspondência: luruschel@upf.br

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

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

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

INTRODUÇÃO

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

A pesquisa de *Salmonella* spp. para avaliação da contaminação em abatedouros por métodos qualitativos já é realizada, mas a quantificação da bactéria não é rotineiramente empregada, uma vez que técnicas tradicionais de enumeração como o Número Mais Provável (NMP), que utilizam

séries de tubos múltiplos, demandam tempo, pessoal e recursos financeiros elevados (Cavada et al. 2010), dificultando sua aplicação em programas de monitoria. Métodos de quantificação de bactérias por Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) são citados como uma alternativa mais rápida e menos trabalhosa para enumeração de salmonelas (Fravallo et al. 2003, Pavic et al. 2009) mas foram aplicados em amostras artificialmente contaminadas para validação destas técnicas.

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e pontos de coleta nos abatedouros

As coletas foram realizadas em três abatedouros de frangos de corte (A, B e C) sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) no sul do Brasil, entre setembro de 2013 e janeiro de 2014, com duas visitas em cada abatedouro. Determinou-se seis pontos de coleta em função dos resultados de estudos anteriores (dados não mostrados) que apontaram estes pontos com positividade para *Salmonella* spp., como segue: recepção das aves (*swabs* de cloaca e esponjas de gaiolas de transporte antes e após a higienização) e carcaças após pré resfriamento em *chiller*, após o gotejamento e imediatamente antes da embalagem primária e carcaças congeladas a -12°C por 24 horas.

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

Processamento das amostras *Swabs* de cloaca

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

Esponjas de gaiolas de transporte

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

Carcaças

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

Pesquisa de *Salmonella* spp. por microbiologia convencional

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

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

Para quantificação de *Salmonella* spp. nas amostras naturalmente contaminadas foi utilizado o método do mNMP proposto por Fravallo et al. (2003) e adaptado por Colla et al. (2014), que contém as mesmas fases da microbiologia convencional mas executadas em placas de 24 poços com capacidade para 2,5mL. Previamente ao experimento foram realizados ensaios para determinar o limite de detecção do mNMP em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas com *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, que apontaram um limite de 0,13 NMP/mL. Na condução do experimento utilizou-se os 7,5mL oriundos do processamento das amostras e transferiu-se 2,5mL para cada um dos poços das três primeiras cavidades na primeira linha das placas, representando uma amostra. Destes, 0,5 mL de cada cavidade foram transferidos para 2 mL de água peptonada 1,0%, previamente vertidos nas linhas seguintes na mesma placa. Três diluições sucessivas foram realizadas da mesma maneira. As placas foram então incubadas para o pré-enriquecimento a 37±1°C por 16 a 20 horas.

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

Após o pré-enriquecimento, as placas foram mantidas em agitação orbital por três a cinco minutos e, com pipetador multicanal, transferiu-se 20µL de cada poço para a cavidade correspondente em outra placa contendo 2mL de MSRV, incubando-as por 24 a 48 horas a 41,5±0,5°C. Após este período, a viragem da cor azul esverdeada do meio MSRV para a cor branca ou azul claro

era indicativa de crescimento bacteriano, o que era confirmado pela sementeira do conteúdo destes poços em Agar Rambach®. Colônias com crescimento compatível com *Salmonella* spp. foram semeadas em Agar não seletivo, incubadas a 37±1°C por 18 a 24 horas e submetidas a confirmação bioquímica e sorológica como na microbiologia convencional.

Cálculo do Número Mais Provável miniaturizado

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

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

Sendo:

P = número de tubos positivos;

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

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

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

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

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

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

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

Portanto:

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

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

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

Para a obtenção do resultado final, referente à área das gaiolas, o NMP obtido pela combinação de poços positivos precisa ser convertido para NMP/cm², utilizando o cálculo a seguir:

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificou-se *Salmonella* spp. em três dos seis pontos do fluxograma de abate de frangos de corte e em dois dos três

estabelecimentos amostrados, independentemente do método utilizado (Quadro 1), totalizando 5,5% de positividade (6/108).

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

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

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

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

ficação de patógenos em ambientes de produção comercial.

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

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

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

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

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

+ Isolamento positivo, - Sem isolamento.

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

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

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

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

Dentre os sorovares isolados, *S. Typhimurium* é frequentemente isolada em casos clínicos em suínos e humanos, além de apresentar multirresistência à antimicrobianos e capacidade de formar biofilmes como um fator determinante na contaminação de equipamentos na indústria (Castelijin et al. 2013). Em países como a Alemanha (Methner et al. 2011), Portugal (Gomes-Neves et al. 2012), China (Yang et al. 2013) e Inglaterra (Mueller-Doblies et al. 2013) é o sorovar mais isolado em carcaças de suínos, semelhante aos estudos em abatedouros no Brasil (Castagna et al. 2001, Bessa 2006, Borowsky et al. 2006, Müller et al. 2009, Kich et al. 2011).

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

S. Rissen é pouco frequente em infecções em humanos e não tem um reservatório específico identificado, mas a importância deste sorovar está aumentando em países como a Tailândia, com ocorrência em água e alimentos, principalmente frutos do mar (Skovgaard 2005). Na Finlândia, *S. Rissen* tem sido frequentemente isolada em aves desde 2003 (Bangtrakulnonth et al. 2004) e, no Brasil, há relatos de isolamento em humanos entre 1950 e 1990 (Kumar et al. 2001). No entanto, o risco para a população brasileira estaria relacionado principalmente ao consumo de carne suína, uma vez que o sorovar é comumente isolado nesta espécie (Fernandes et al. 2006).

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

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

A infecção por *Salmonella* pode ter origens distintas nas granjas comerciais e em abatedouros, o que justifica a variabilidade dos sorovares encontrados em cada região (Alban & Stark 2005). No Brasil, destacam-se estudos sobre sorovares isolados na região sul (Castagna et al. 2001, Bandeira et al. 2007, Spricigo et al. 2008, Michael et al. 2008, Müller et al. 2009, Kich et al. 2011) e centro-oeste (Silva et al. 2009) onde são observadas diferenças entre os sorovares isolados em cada estudo, possivelmente devido a extensão do país e a variedade da produção animal.

CONCLUSÕES

Não foi possível correlacionar os resultados da microbiologia convencional e do mNMP ou mesmo quantificar a contaminação nos pontos amostrados, indicando a necessidade de aliar métodos qualitativos e quantitativos para identificação de *Salmonella* spp. em pontos críticos de controle no abate de frangos de corte.

Os sorovares identificados são considerados paratíficos e portanto potencialmente capazes de causar infecções em humanos.

A identificação de *Salmonella* spp. nas gaiolas de transporte após a higienização é um indicativo da necessidade de revisão e adequação dos métodos automatizados de lavagem atualmente utilizados nos abatedouros.

Agradecimentos.- Ao apoio financeiro do CNPq, via Edital MCT/CNPq/ MAPA/DAS nº 64/2008 - Ações de Defesa Agropecuária, sob o número 578124/2008-4.

REFERÊNCIAS

- Alban L. & Stärk K.D.C. 2005. Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* presence in the slaughtered swine carcass effectively? *Prev. Vet. Med.*, Amsterdam, 68:63-79.
- Baggensen D.L., Bagger J., Mogelmose V., Nielsen B., Svensmark B. & Olsen J.E. 2001. Quantification of DT104 in slurry from infected pigs. Report on the 6th CRL-Salmonella Workshop, Bilthoven, Netherlands, p.30-32.
- Bandeira R., Pelegrini D.C.P. & Cardoso M. 2007. Ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes de pernil provenientes de lotes suínos portadores ao abate. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, 35:203-208.
- Bangtrakulnonth A., Pornreongwong S., Pulsrikarn C., Sawanpanyalert P., Hendriksen R.S., Wong D.M.A.L.F. & Aarestrup F.M. 2004. *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 10:131-6.
- Benajssaum B.R., Gallasum N., Troudium B.H., Belhadjum B. & Belhadium A.B. 2007. Trends in *Salmonella* entérica serotypes isolated from food, humans, animals and environment in Tunisia, 1994-2004. *J. Infection* 55:324-339.
- Berchieri J., Freitas Neto O.C., Angela H.L., Soares N.M., Guastalli E.A.L. & Almeida A.M. 2013. *Salmonella* spp. in Meat-type Quails (*Coturnix coturnix*) in the State of São Paulo, Brazil. *Revta Bras. Ciênc. Avícola* 15(3):169-286.
- Bessa M.C. 2006. Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* entérica sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 144p.
- Borowsky L.M., Bessa M.C., Cardoso M. & Avancini C.A.M. 2006. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodofores. *Ciência Rural* 36(5):1474-1479.
- Castagna S.M.F., Bessa M.C., Carvalho D.A., Cardoso M. & Costa M. 2001. Resistência a antimicrobianos de amostras de *Salmonella* sp. isoladas de suínos abatidos no estado do rio grande do sul. *Arqs Fac. Vet. UFRGS*. 29(1):44-49.
- Castelijn G.A.A., Parabirsing J.A., Zwietering M.H., Moezelaar R. & Abee T. 2013. Surface behavior of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Bradenburg* and *S. Infantis*. *Vet. Microbiol.* 161:305-314.
- Cavada C.A., Cardoso F.M. & Schimidt V. 2010. Comparison of three methods for *Salmonella* sp. quantification in wastewater. *Acta Scientiae Veterinariae* 38(1):17-23.
- Chen L., Zhang J., Yang X., Wu Q. & Xu M. 2013. [Prevalence and characterization of *Salmonella* spp. from foods in South China]. [Article in Chinese]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 453(12):1326-1333.
- Colla F.L., Mion L., Parizotto L., Rodrigues L.B., Pilotto F., Dickel E.L., Nascimento V.P. & Santos L.R. 2014. Miniaturized most probable number for the enumeration of *Salmonella* sp. in artificially contaminated chicken meat. *Revta Bras. Ciênc. Avícola* 16(1):45-48.
- Corry J.E.L., Allen V.M. & Hudson W.R. 2002. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *J. Appl. Microbiol.* 92:424-432.
- Dickel E.L., Santos L.R., Rodrigues L.B., Valle S.F. & Cecatti D. 2005. Ocorrência de *Salmonella* em abatedouros de aves com tecnologia totalmente automatizada (grande porte), semi automatizada (médio porte) e semi automatizada (pequeno porte). *Higiene Alimentar*, São Paulo, 19(131):62-67.
- Duarte D.A.M., Ribeiro A.R., Vasconcelos A.M.M., Santos S.B., Silva J.V.D., Andrade P.L.A. & Falcão L. 2009. Occurrence of *Samonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Braz. J. Microbiol.* 40(3):569-573.
- Fernandes S.A., Tavechio A.T., Ghilardi A.C.R., Dias A.M.G., Almeida I.A. & Melo L.C.V. 2006. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Revta Inst. Med. Trop. São Paulo* 48: 174-189.
- Fravalo P., Hascoet Y., Le Fellic M., Quegumer S., Petton J. & Salvat G. 2003. Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella* enteric contamination: the mini-MSRV MPN technique. *J. Rapid Methods and Automation in Microbiology* 11(2):81- 88.
- Gast R., Guraya R. & Guard-Bouldin J. 2007. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. *Avian Dis.* 51:40-44.
- Gomes-Neves E., Antunes P., Tavares A., Themudo P., Cardoso M.F., Gärtner F., Costa J.M. & Peixe L. 2012. *Salmonella* cross contamination in swine abattoirs in Portugal: Carcasses, meat and meathandlers. *Int. J. Food Microbiol.* 157:82-87.
- Hofer E., Silva S.J. & Reis E.M.F. 2007. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 18(1):21-27.
- Humphrey T. & Jorgensen F. 2006. Pathogens on meat and infection in animals. Establishing a relationship using *Campylobacter* and *Salmonella* as examples. *Meat Science* 74:89-97.
- Kich J.D., Coldebella A., Morés N., Nogueira M.G., Cardoso M., Fratamico P.M., Call J.E., Fedorka-Cray P. & Luchansky J.B. 2011. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 151:307-313.
- Kumar S., Sadana J.R. & Mishra S.K. 2001. Studies on clinical signs, growth response and haematological changes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) infected with *Salmonella* typhimurium. *Indian J. Poult. Sci.* 36:335-337.
- Lillard H.S. 1990. The Impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. *J. Food Protection* 53(3):202-204.
- Mazengia E., Samadpour M., Hill H.W., Greeson K., Tenney K., Liao G., Huang X. & Meschke J.S. 2014. Prevalence, concentrations, and antibiotic sensitivities of *Salmonella* serovars in poultry from retail establishments in Seattle, Washington. *J. Food Protection* 77(6):885-93.
- Methner U., Rammler N., Fehlhaber K. & Rösler U. 2011. *Salmonella* status of pigs at slaughter - Bacteriological and serological analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 151:15-20.
- Michael G.B., Cardoso M. & Schwarz S. 2008. Molecular analysis of multi resistant porcine *Salmonella* entérica subsp. Entérica serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II. *J. Antimicrobial Agents* 32:120-129.
- Moreira G.N., Rezende C.S.M., Carvalho R.N., Mesquita S.Q.P., Oliveira A.N. & Arruda M.L.T. 2009. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. *Revta Inst. Adolfo Lutz* 67(2):126-130.
- Mueller-Doblies D., Speed K. & Davies R.H. 2013. A retrospective analysis of *Salmonella* serovars isolated from pigs in Great Britain between 1994 and 2010. *Prev. Vet. Med.* 110:447-455.
- Müller M., Schwarz P., Kich J.D. & Cardoso M. 2009. Perfil sorológico e de isolamento de *Salmonella* sp. em suínos no início da terminação e ao abate. *Ciênc. Anim. Bras.* 10(3):931-937.
- Noel H., Hofhuis A., De Jong R., Heuvelink A.E., De Jong R. & Jager C. 2010. Consumption of Fresh Fruit Juice: How a Healthy Food Practice Caused a National Outbreak of *Salmonella* Panama Gastroenteritis. *Foodborne Pathogens and Disease* 7(4):375-381.
- Patterson J.T. 1971. Microbiological aspects of poultry processing. *Brit. Poult. Sci.* 12:197-203.
- Phan T.T., Khai L.T., Ogasawara N., Tam N.T., Okatani A.T., Akiba M. & Hayashidani H. 2005. Contamination of *Salmonella* in retail meats and shrimps in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Food Protection* 68:1077-1080.
- Pavic A., Groves P.J., Bailey G. & Cox J.M. 2009. A validated miniaturized MPN method, based on ISO 6579:2002, for the enumeration of *Salmonella* from poultry matrices. *J. Appl. Microbiol.* 109:25-34.
- Ribeiro A.R., Kellermann A., Santos L.R. dos, Bessa M.C. & Nascimento V.P. do. 2007. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicro-

- bial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. *Braz. J. Microbiol.* 38:296-299.
- Santos D.M.S., Berchieri Jr A., Fernandes S.A., Tavechio A.T. & Amaral L.A. 2000. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesq. Vet. Bras.* 20(1):39-42.
- Silva M.C., Faria G.S., De Paula D.A.J., Martins R.P., Caramori Junior J.G., Kichi J.D., Colodel E.D., Nakazato L. & Dutra V. 2009. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. *Ciência Rural* 39:266-268.
- Simas V.S., Santos F.F., Gouvêa R., Aquino M.H.C., Abreu D.L.C., Nascimento E.R. & Pereira V.L.A. 2011. Pré-resfriamento na redução de coliformes em carcaças de frango de corte. *Ciência Rural* 43(9):1618-1622.
- Skovgaard N. 2005. Current topics in food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 99:107-111.
- Skjerve E. & Olsvik O. 1991. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 14:11-18.
- Spricigo D.A., Matsumoto S.R., Espíndola M.L. & Ferraz S.M. 2008. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguiça fresca suína. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28:779-785.
- Ta Y.T., Nguyen T.T., To P.B., Pham X., Le H.T., Thi G.N., Alali W.Q., Walls I. & Doyle M.P. 2014. Quantification, serovars, and antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from retail raw chicken meat in Vietnam. *J. Food Protection* 77(1):57-66.
- Thomas H.A. 1942. Bacterial densities from fermentation tube tests. *J. Am. Water Assoc.* 34:572-576.
- USDA-FSIS 2008. Compliance Guideline for Controlling *Salmonella* and *Campylobacter* in Poultry. 2nd ed. Food Safety Inspection Service, United States Department of Agriculture, Washington, DC. Available at <<http://www.fsis.usda.gov>> Accessed in March 2013.
- Wang Y., Chen Q., Cui S., Xu X., Jianghui Zhu., Luo H., Wang D. & Li F. 2014. Enumeration and Characterization of *Salmonella* Isolates from Retail Chicken Carcasses in Beijing, China. *Foodborne Pathogens and Disease* 11(2):126-132.
- Yang B., Cui Y., Shi C., Wang J., Xia X., Xi M., Wang X., Meng J., Alali W.Q., Walls I. & Doyle M.P. 2014. Counts, serotypes, and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates on retail raw poultry in the People's Republic of China. *J. Food Protection* 77(6):894-902.
- Yang B., Qiao L., Zhang X., Cui Y., Xia X., Cui S., Wang X., Meng X., Ge W., Shi X., Wang D. & Meng J. 2013. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. *Food Control, Guildford*, 32:228-235.