

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Fabiana Fernanda Pacheco da Silva

(Médica Veterinária – UFRGS)

**INVESTIGAÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. E MICRORGANISMOS INDICADORES
EM CARÇAÇAS BOVINAS DURANTE O PROCESSAMENTO EM
ABATEDOURO - FRIGORÍFICO**

Porto Alegre
Janeiro de 2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Fabiana Fernanda Pacheco da Silva

(Médica Veterinária – UFRGS)

**INVESTIGAÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. E MICRORGANISMOS INDICADORES
EM CARÇAÇAS BOVINAS DURANTE O PROCESSAMENTO EM
ABATEDOURO - FRIGORÍFICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Porto Alegre
Janeiro de 2011

S586i Silva, Fabiana Fernanda Pacheco da
Investigação de *salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouro - frigorífico. / Fabiana Fernanda Pacheco da Silva. -- Porto Alegre, 2011.

58f. : il.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR-RS, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Bibliografia

1. Segurança dos alimentos 2. *Salmonella* spp 3. Carne bovina
I. Título. II. Tondo, Eduardo César (Orient.).

CDU 664:576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Fabiana Fernanda Pacheco da Silva
(Médica Veterinária - UFRGS)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:

Homologada em:

Pela Banca Examinadora:

Por:

EDUARDO CESAR TONDO
Orientador – PPGCTA/UFRGS

JOSÉ MARIA WIEST
Coordenador do Programa de
Pós Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos (PPGCTA)

MARISA RIBEIRO DE ITAPEMA
CARDOSO
Banca – UFRGS/RS

ADRIANO BRANDELLI
Banca – PPGCTA/UFRGS

VITOR MANFROI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

ANDREA TROLLER PINTO
Banca – UFRGS/RS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo pelos ensinamentos, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de crescimento e desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos por ter me recebido e acolhido maravilhosamente.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

À USP e à Prof. Dra. Bernadette D. G. de Melo Franco pela oportunidade de conhecer o seu laboratório e pelo treinamento para a execução desse projeto.

À Capes pela bolsa de estudos e à FAPERGS pela bolsa de iniciação científica, para a realização desse trabalho.

À Fernanda Stoduto Ferreira, que entrou comigo no mestrado e desde o primeiro dia se mostrou minha amiga. Fé, muito obrigada pela amizade sincera, pelo carinho, pelos conselhos, pelas terapias florais e por ter me feito ver o quão maravilhosa eu posso ser.

À Márcia Loiko, pela amizade sincera, pelo carinho e por sempre acreditar em mim, as vezes mais que eu.

À Juliana Guedes Silveira, pela amizade, pelo companheirismo e por ter sido a minha companheira fiel e incansável nas viagens para coleta. Ju, vencemos mais essa.

As minhas duas bolsistas de iniciação científica, Mariana Horvath e Ana Carolina Langone, que foram meu “braço direito” e “braço esquerdo”, respectivamente. Meninas, muito obrigada pela ajuda e por terem abraçado este projeto junto comigo. Vocês foram as melhores iniciações científicas que uma mestranda poderia ter.

À Cheila de Paula, pelos conselhos e pela ajuda, principalmente por fornecer o material de estudos para a seleção da bolsa de mestrado.

À Prof. Dra. Florência Cladera, pela ajuda com a análise estatística dos dados do experimento.

À Letícia Casarin, pela ajuda nas consultas as legislações.

A minha família, principalmente meus pais, que sempre me apoiaram nas minhas decisões e sempre estiveram ao meu lado.

Aos Professores do PPGCTA que me trouxeram sempre seus conhecimentos e ajudaram na construção desse trabalho.

A todos aqueles que eu convivi durante este período e me trouxeram algum ensinamento, muito obrigada.

Investigação de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouro – frigorífico

Autor: Fabiana Fernanda Pacheco da Silva

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

RESUMO

O Brasil é líder mundial em exportação de carne bovina. A qualidade e a segurança dos produtos cárneos são essenciais para permanecer como exportador no competitivo mercado internacional. Atualmente, critérios microbiológicos são usados para avaliar produtos cárneos, e *Salmonella* tem sido usada como um importante indicador da segurança dos alimentos por diversos países. No presente estudo, um total de 120 carcaças foram analisadas em três diferentes pontos do processo de abate em um abatedouro-frigorífico exportador localizado no sul do Brasil. Os resultados demonstraram que quatro carcaças (3,3%) foram positivas para *Salmonella*. Todas as amostras positivas foram coletadas do couro depois da sangria (Primeiro ponto de coleta – P1), e *Salmonella* não foi encontrada nas amostras coletadas após a retirada do couro (Segundo ponto de coleta – P2) e antes do último toalete (Terceiro ponto de coleta – P3). Seis isolados foram obtidos e classificados em três sorovares diferentes; *S. Newport* (n=3), *S. Saintpaul* (n=2) e *S. Anatum* (n=1). As cepas de *Salmonella* também foram analisadas quanto à susceptibilidade antimicrobiana, usando 15 antimicrobianos recomendados pelo CLSI. Nenhuma cepa apresentou resistência a qualquer um dos antimicrobianos testados. Além da investigação de *Salmonella*, a contagem de *Escherichia coli* foi realizada em todos os três pontos do processo. O ponto mais contaminado foi o primeiro (couro) que apresentou contagens variando de 0,31 a 5,07 log UFC/100 cm². O segundo e o terceiro ponto apresentaram contagens variando de N. D (não detectado) a 2,42 log UFC/100 cm² e N. D a 2,10 log UFC/100 cm², respectivamente. Uma redução significativa da contagem de *E. coli* foi observada entre o primeiro e os outros demais pontos. Os resultados indicaram que o risco de contaminação das carcaças ainda existe principalmente do couro. A implementação de Boas Práticas de Fabricação e dos princípios do APPCC são importantes ferramentas para prevenir a contaminação microbiana em carcaças.

Palavras-chave: *Salmonella*, susceptibilidade antimicrobiana, *Escherichia coli*

Investigation of *Salmonella* spp. and indicators microorganisms in beef carcasses during the process in slaughterhouse

Author: Fabiana Fernanda Pacheco da Silva

Advisor: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

ABSTRACT

Brazil is the leading exporter of beef worldwide. The quality and safety of the meat products are essential to remain as an exporter in the very competitive international market. Currently, microbiological criteria are used to evaluate meat products, and *Salmonella* has been used as an important food safety indicator in many countries. In the present study, a total of 120 carcasses were analyzed in three different steps of the slaughter process in an exporter slaughterhouse located in southern Brazil. The results demonstrated that four carcasses (3.3%) were positive for *Salmonella*. All the positive samples were collected on the hides after the bleeding (First collection step – P1), and *Salmonella* was not found in the samples collected after the removal of the hides (Second collection step – P2) and before the last toilet (Third collection step – P3). Six isolates were obtained and were classified in three different serovars, i. e. *S. Newport* (n=3), *S. Saintpaul* (n=2) and *S. Anatum* (n=1). The *Salmonella* strains were also examined for antimicrobial susceptibility using 15 drugs recommended for CLSI. None strains exhibited resistance to any of the antimicrobials tested. In addition to the *Salmonella* investigation, *Escherichia coli* counts were carried out in the three processing points. The most contaminated point was the first (hide) that showed counts ranged from 0.31 to 5.07 log CFU/100 cm². The second and the third points demonstrated counts ranged from N.D (not detected) to 2.42 log CFU/100 cm² and N.D to 2.10 log CFU/100 cm², respectively. A significant reduction of the *E. coli* counts was observed among the first and the other points. Results indicated that the risk of contamination of the carcasses still exists, mainly from the hides. The implementation of Good Manufacturing Practices and HACCP principles are important to avoid microbial contamination.

Keywords: *Salmonella*, antimicrobial susceptibility, *Escherichia coli*

LISTA DE FIGURAS

FIGURE 1. *Slaughter line of a Brazilian exporter slaughterhouse. Horizontal arrows indicate the localization of the three collection points. P1 – first collection point. P2 – second collection point. P3 – third collection point. 40*

LISTA DE TABELAS

TABLE 1. *Number of carcasses sampled and city of origin of the animals in each collection day in a Brazilian Southern Slaughterhouse* 38

TABLE 2. *Means values of E. coli and free chlorine in water in three points of one slaughterhouse of Southern Brazil* 39

LISTA DE ABREVIATURAS

° C: grau Celsius

ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne

ANOVA: Análise de Variância

APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

atm: atmosfera

BPF: Boas Práticas de Fabricação

BPW: Buffered Peptone Water

CDA – ARMPOA: Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para Avaliação de Riscos Microbiológicos em Produtos de Origem Animal

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CFU: Colony-Forming Unit

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

cm: centímetro

cm²: centímetro quadrado

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

EUA: Estados Unidos da América

FDA: Food and Drug Administration

h: hora

HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Points

ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

ISO: International Organization for Standardization

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

min: minutos

MKTTn: Muller Kauffmann Tetrathionate – novobiocin

ml: mililitro

MLCB: Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant green

n: número

NaCl: Cloreto de Sódio

N. D: Não Detectado

OMC: Organização Mundial do Comércio

P1: Ponto 1

P2: Ponto 2

P3: Ponto 3

ppm: partes por milhão

RS: Rio Grande do Sul

RVS: Rappaport Vassiliadis with soya

S: *Salmonella*

SE 86: *Salmonella* Enteritidis nº 86

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

USA: United States of America

XLD: Xylose Lysine Desoxycholate

XLD: Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1.1 INTRODUÇÃO	13
1.2 OBJETIVO GERAL	14
1.2.1 Objetivos específicos	14
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.3.1 Características gerais de <i>Salmonella</i> e salmonelose	15
1.3.2 <i>Salmonella</i> em carne bovina	18
1.3.3 <i>Salmonella</i> isolada de carne bovina e resistência a antimicrobianos	21
1.3.4 <i>Escherichia coli</i> em carcaças bovinas	22
CAPÍTULO 2	24
2.1 RESULTADOS	25
2.1.1 Prevalence and Antimicrobial Resistance of <i>Salmonella</i> spp. Isolated from Beef Carcasses in a Brazilian Exporter Slaughterhouse	25
CAPÍTULO 3	41
3.1 DISCUSSÃO GERAL	42
REFERÊNCIAS	51

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América, o Brasil é o líder em exportações de carne bovina no mundo (USDA, 2009). A pecuária de corte e a exportação de carne bovina são muito importantes para o agronegócio brasileiro. Devido a sua importância no mercado nacional e internacional, a qualidade da carne bovina brasileira deve atender rigorosas exigências para ser comercializada no Brasil ou em outros países, sendo que uma das exigências mais importantes é a qualidade microbiológica dos produtos. No caso de *Salmonella*, tanto o mercado nacional quanto a maioria dos países importadores exige a ausência deste microrganismo nos produtos cárneos bovinos.

O Acordo de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias da Organização Mundial de Comércio (OMC) estabelece que, em relação ao controle dos perigos microbiológicos em alimentos, a Análise de Risco (*Risk Assessment*) é a ferramenta indicada para proteger a saúde dos consumidores e garantir práticas equitativas no comércio nacional e internacional.

Neste projeto foi investigada a ocorrência de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores da qualidade higiênico - sanitária em carcaças bovinas, durante as etapas de processamento, em um abatedouro-frigorífico exportador, localizado no Sul do Brasil. Os dados obtidos nessa investigação farão parte de uma Análise de Risco para carne bovina brasileira a ser realizada em conjunto com outros laboratórios do país e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os experimentos foram direcionados para a avaliação da presença e para a enumeração da *Salmonella* spp., em diferentes pontos do processo de abate de bovinos, objetivando identificar os sorovares prevalentes e os perfis de resistência aos antimicrobianos dos microrganismos isolados. Além disso, a enumeração de microrganismos indicadores da qualidade higiênico – sanitária (*Escherichia coli*) foi realizada para verificar o nível de contaminação das carcaças e o controle de processo no abatedouro – frigorífico.

1.2 OBJETIVO GERAL

Investigar *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouro-frigorífico exportador.

1.2.1 Objetivos específicos

- Isolar e identificar os sorovares de *Salmonella* spp. presentes em carcaças bovinas em um abatedouro - frigorífico, no RS;
- Quantificar *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores de qualidade higiênico – sanitária (*Escherichia coli*) em carcaças bovinas durante o processo de abate dos animais;
- Investigar a resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Salmonella* sp.;
- Avaliar as possíveis correlações entre a presença e quantificação de *Salmonella* e microrganismos indicadores da qualidade higiênico – sanitária nos pontos amostrados;

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Características gerais de *Salmonella* e salmonelose

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bastonetes Gram negativos, predominantemente móveis devido à presença de flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos. Produz ácido e gás, a partir da fermentação de D - glicose e outros carboidratos, porém geralmente não fermentam a lactose. São indol negativos, oxidase negativos, catalase positivos e produzem gás sulfídrico (FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M., 2003).

A temperatura ótima para crescimento é 37° C, porém desenvolvem-se numa faixa de crescimento de 7° C a 45° C, são resistentes à dessecação e ao congelamento, possuindo a capacidade de sobreviver no ambiente por anos (WILCOCK, B. P.; SCHWARTZ, K. J., 1993). No entanto, são sensíveis à luz solar e à maioria dos desinfetantes como fenóis, compostos clorados e iodados (SOBESTIANSKY, J. et al., 1999).

O crescimento de *Salmonella* spp. ocorre em um pH ótimo entre 6,5 e 7,5, admitindo uma variação entre 4,5 e 9,0. Valores inferiores a 4,1 podem inativar e destruir a *Salmonella* spp. (TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L., 2005).

Atualmente, o gênero *Salmonella* spp. é composto por 2.610 sorovares, baseados em reações bioquímicas e sorológicas (GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEIL, F.-X., 2010). A maioria dos sorovares não é adaptada a um único hospedeiro, podendo causar doenças tanto no homem como em animais (JAY, J. M., 2005). No entanto, apenas um pequeno número dentre estes sorovares estão freqüentemente associados à doença, como Typhimurium e Enteritidis. Estes podem causar infecções intestinais de severidade variada, estando envolvidos nos casos clássicos de toxinfecções alimentares (JAY, J. M., 2005).

Salmonella spp. é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no mundo e pode causar enterocolite (salmonelose), febre tifóide e septicemia (ARSLAN, S.; EYI, A., 2010).

A transmissão de *Salmonella* spp. ao homem pode ocorrer pelo contato direto com animais, tanto nas granjas quanto nos frigoríficos, mas principalmente devido à

ingestão de alimentos contaminados. Embora muitos produtos possam estar contaminados por *Salmonella* spp., os produtos de origem animal são os mais frequentemente contaminados e, a ingestão deste tipo de produto contaminado é uma das formas mais comuns de infecção por *Salmonella* spp. (JAY, J. M., 2005), o que pode resultar em toxinfecções alimentares.

Em humanos, os sintomas iniciais da doença ocorrem de 8 a 24 horas após a ingestão do alimento contaminado, embora períodos mais curtos e longos já tenham sido relatados. Os sintomas consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia. Esses sintomas são, geralmente, acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, febre moderada, nervosismo e sonolência, os quais persistem por 2 a 3 dias (JAY, J. M., 2005). Durante a salmonelose aguda, as fezes podem conter um bilhão de células de *Salmonella* por grama. Alguns sorovares de *Salmonella*, como a *S. Typhi*, podem penetrar no intestino e ganhar acesso à corrente sanguínea, causando bacteremia (ATLAS, R. M., 1997), entretanto as infecções apresentam maior tendência de permanecerem localizadas.

O risco de desenvolver salmonelose pelo consumo de alimento é influenciado por diversos fatores, como por exemplo: a presença e a quantidade de *Salmonella* spp. no alimento, a composição do produto, a manipulação e as práticas no preparo do alimento, a suscetibilidade dos consumidores primários, entre outros (WEGENER, H. C.; BAGER, F., 1997).

Dependendo do sorovar e do alimento, a dose infectante em pessoas saudáveis pode variar de menos de 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) no caso de sorovares adaptados ao homem, até 10^7 UFC para sorovares não adaptados ao homem. Em alimentos com elevado teor de gordura e proteínas, a dose infectante pode ser menor devido à proteção das células contra o suco gástrico (VARNAM, A. H., 1991).

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) causadas por *Salmonella* são consideradas um grande problema para a saúde pública. No Brasil, um notável aumento na incidência de *S. Enteritidis* em toxinfecções alimentares em humanos vem sendo registrado nos últimos anos. (FUZIHARA, T. O; FERNANDES, S. A.; FRANCO, B. D. G. de M., 2000; SANTOS, D. M. S. et al., 2000).

A ocorrência de *S. Enteritidis*, no Estado de São Paulo, tem aumentado acentuadamente desde 1994, sendo este sorovar o mais freqüente responsável por

surtos de toxinfecções alimentares e casos esporádicos de doenças gastrintestinais em humanos. Também tem sido observado um aumento de *S. Enteritidis* isolada em hemoculturas, principalmente em crianças e pacientes com imunodeficiência (TAVECHIO, A.T. et al., 1996). Este sorovar de *Salmonella*, *S. Enteritidis*, tem sido reconhecido como a maior causa de salmonelose em todo o mundo (AGRON, P.G. et al., 2001).

A Vigilância Sanitária do RS aponta *Salmonella* sp. como o agente etiológico responsável pelo maior número de casos de DTA. Surtos de salmonelose atingiram 47,4% (334 surtos) do total de 1037 surtos investigados no ano de 2000 (RELATÓRIOS ANUAIS, SES/DVS/RS, 2000).

No RS, no período entre 2000 e 2001, os surtos de salmonelose investigados demonstraram que a população envolvida foi de 14.253 pessoas expostas, das quais 3.400 ficaram doentes, 1.938 foram hospitalizadas e 2 pessoas morreram. Entre os doentes, a faixa etária mais frequentemente envolvida foi entre 20 e 49 anos, e a incidência em homens e mulheres foi praticamente a mesma. Os casos ocorreram principalmente entre a primavera e o início do verão. Os locais mais freqüentes de ocorrência dos surtos foram residências (61,5%) e estabelecimentos comerciais (13,7%). O principal alimento envolvido foi salada de batata com maionese caseira (48,1%), seguida de carne e produtos cárneos (22,6%). As principais causas associadas à ocorrência dos surtos foi o uso de matéria-prima sem inspeção (34,1%) (especialmente ovos) e abuso de tempo e temperatura (temperatura ambiente por mais de 2 horas) (20,3%) (SILVEIRA, J. B.; TONDO, E.C., 2006). Também no RS, Costalunga e Tondo (2002) relataram que nos surtos alimentares investigados no período de 1997 a 1999, a “maionese caseira” foi o alimento mais envolvido nesses surtos (42,45%).

Outros estudos investigando cepas de *Salmonella* spp do RS reportaram informações muito importantes sobre este patógeno. Geimba et al. (2004) mostraram que mais de 97% das salmoneloses ocorridas no RS, durante o período de 1999 a 2002, foram causadas por *S. Enteritidis*. Utilizando o perfil de resistência antimicrobiana das cepas de *S. Enteritidis* concluiu-se que a maioria dos surtos foram causados por um grupo clonal específico de *S. Enteritidis* (SE 86) (GEIMBA, M. P. et al., 2005). Em sequência a esses estudos, Oliveira et al. (2007) usaram métodos moleculares para comparar cepas de *S. Enteritidis* isoladas de

coproculturas de vítimas de salmonelose com cepas de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em surtos alimentares ocorridos no RS durante o período de 1999 a 2006, e observou que o mesmo grupo clonal (SE 86) foi envolvido na maioria dos surtos. De Paula et al. (2005) avaliaram a inativação de *S. Enteritidis* por métodos de cozimento e fritura de ovos comumente usados em residências no RS. Os resultados mostraram que, quando ovos com casca contaminados foram colocados em água e lentamente cozidos, *Salmonella* foi completamente inativada depois de 1 min de fervura. Contudo, em ovos colocados diretamente em água fervente, a população foi eliminada apenas após 3 min. Em ovos fritos, a redução da população foi observada após fritura de 1,5; 2,0 e 2,5 min. Mesmo que a solidificação da gema tenha sido apontada como um indicador da eliminação da *S. Enteritidis* na gema do ovo, uma atenção deve ser dada aos procedimentos de fritura, pois níveis consideravelmente elevados desse microrganismo podem ser recuperados mesmo a partir de gemas parcialmente solidificadas.

A salmonelose, freqüentemente, é causada pelo consumo de carne (JAY, J. M., 2005). No RS, a carne bovina foi o 3º alimento mais envolvido em surtos alimentares no ano de 2000 (RELATÓRIOS ANUAIS, SES/DVS/RS, 2000).

1.3.2 *Salmonella* em carne bovina

Diversos estudos demonstraram a presença de *Salmonella* na carne bovina. Um estudo sobre a qualidade da carcaça e da carne desossada produzida na Austrália foi conduzido durante o período de junho a novembro de 1998. As amostras de carcaças e carnes desossadas (n=1.275) foram coletadas de estabelecimentos exportadores e estabelecimentos que forneciam carne para o mercado interno. *Salmonella* foi detectada em 0,2% das carcaças e em 0,1% das carnes desossadas. Não foi encontrada diferença significativa na prevalência de *Salmonella* entre os tipos de estabelecimentos (PHILLIPS, D.; SUMMER, J.; ALEXANDER, J. F.; DUTTON, K. M., 2001).

O Sistema de Inspeção de Carne dos Estados Unidos realizou um estudo em sete abatedouros-frigoríficos para verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças bovinas. As amostras foram coletadas antes da evisceração dos animais, depois da lavagem da carcaça e após 24 h de refrigeração, em três locais diferentes

da carcaça de novilhos (peito, flanco e posterior). Os resultados demonstraram que o percentual de ocorrência de *Salmonella* no peito, no flanco e no posterior foi, respectivamente, de $0,8 \pm 1,7$; $0; 2,5 \pm 5,0$ na estação úmida e de $0,8 \pm 1,7$; $0; 0$ para a estação seca; a ocorrência em animais adultos foi de $4,4 \pm 2,0$; $2,2 \pm 3,9$; $1,1 \pm 1,9$ para a estação úmida e $2,2 \pm 3,9$; $1,1 \pm 1,9$ e 0 para a estação seca (SOFOS, J. N.; KOCHEVAR, S. L.; REAGAN, J. O.; SMITH, G. C., 1999).

Madden et al. (2001) realizaram um trabalho na Irlanda do Norte com 200 carcaças de bovinos para verificar a prevalência de *Salmonella*, sendo encontrada apenas três amostras positivas, duas do sorovar Mbandaka e uma do sorovar Thompson.

Em oito indústrias embaladoras de carnes, nos Estados Unidos, foi encontrada uma prevalência de 15,4% de *Salmonella* spp. (49 de 319) no couro bovino, reduzindo-se para 1,3% (4 de 320) após os procedimentos de descontaminação. (BACON, R. T; SOFOS, J. N; BELK, K. E; HYATT, D. R; SMITH, G. C., 2002).

Sorensen et al. (2002) analisaram amostras de fezes e carne de bovinos abatidos no Canadá. Das 1.002 amostras de carne moída analisadas, 13 (1,3%) foram positivas para *Salmonella* spp, encontrando-se os sorovares S. Anatum, S. Heidelberg, S. Montevideo, S. Typhimurium, S. Typhimurium var. Copenhagen e S. Rough-O:i:1,2. O sorovar S. Typhimurium var. Copenhagen DT1 foi o mais comum seguido pelo S. Typhimurium, S. Heidelberg DT10. Estudos nos Estados Unidos identificaram S. Anatum, S. Hadar, S. Muenster, S. Meleagridis, S. Typhimurium var. Copenhagen como os sorovares mais comuns na carne bovina.

O Serviço de Inspeção dos EUA verificou a efetividade do sistema APPCC no controle da contaminação da carne bovina por patógenos. Foram analisados estabelecimentos produtores de carne bovina muito pequenos, pequenos e grandes. Os resultados de três anos demonstraram que mais de 80% dos estabelecimentos apresentaram o seguinte padrão de prevalência de *Salmonella*: 2,7% em carne bovina, 1,0% em carne de novilhos e 7,5% em carne moída (ROSE, B. E; HILL, W. E; UMHOLTZ, R.; RANSOM, G. M.; JAMES, W. °, 2002).

Um estudo americano comparou a prevalência de *Salmonella* spp. em gado criado em confinamento e a pasto. As amostras foram tanto do couro como das carcaças dos animais, sendo coletadas em dois momentos: antes e depois do

transporte dos animais até o abatedouro-frigorífico. A contaminação por *Salmonella* no couro dos animais, de ambos os grupos, aumentou de 18 para 20% no grupo dos animais confinados e de 50 para 56% nos animais criados a campo. As carcaças apresentaram uma contaminação de 19% (19) para os animais confinados e de 54% (52) para os animais criados a campo (BEACH, J. C.; MURANO, E. A.; ACUFF, G. R., 2002).

A prevalência de *Salmonella* spp. em ambientes de dois abatedouros em Botsuana foi de 28% de 250 amostras e 23% de 300 amostras (MOTSOELA, C.; COLLISON, E. K.; GASHE, B. A., 2002).

Brichta-Harhay et al. (2007) realizaram um estudo em abatedouros - frigoríficos nos Estados Unidos para verificar a eficácia dos métodos de detecção e enumeração de *Salmonella*, tanto em carcaças quanto em couro bovino. No estudo foram avaliadas 1.520 carcaças e 3038 amostras de couro animal. As amostras foram analisadas para a presença de *Salmonella* por métodos de enriquecimento e enumeração. Os resultados para a contagem média do patógeno para a carcaça e para o couro foram de $1,6 \times 10^0$ UFC/100 cm² e $8,0 \times 10^1$ UFC/100cm², respectivamente. Pelo método de detecção, a prevalência de *Salmonella* foi de 49,8% (757) para carcaças e de 89,6% (2721) para o couro dos animais.

A União Européia constatou que salmonelose foi a segunda mais importante zoonose em 2005, com uma incidência de 38,2 casos por 100.000 habitantes. Carnes e produtos cárneos foram importantes fontes dessa contaminação (NORRUNG, B.; BUNCIC, S., 2008).

O Serviço de Inspeção Americano verificou que alguns fatores, como por exemplo: tipo de produto, tamanho do estabelecimento produtor e ano da produção, estão associados com falhas na cadeia produtiva e a possível contaminação dos produtos por *Salmonella* spp. Produtos com manipulação excessiva, estabelecimentos de pequeno porte e outros fatores são responsáveis pela contaminação de alguns produtos com *Salmonella*. Esse estudo demonstrou que a implantação de BPF e APPCC são necessários para redução deste patógeno em sistemas de produção de alimentos de origem animal (NAUGLE, A.L. et al., 2006).

1.3.3 *Salmonella* isolada de carne bovina e resistência a antimicrobianos

Zhao et al. (2000) isolaram cinco *S. Typhimurium* DT104 de amostras de carne moída, sendo que todas as amostras foram resistentes à ampicilina, estreptomicina, sulfametoxazol, ticarcilina e tetraciclina, e foram sensíveis ao cloranfenicol.

Bacon et al. (2002) isolaram 53 amostras de *Salmonella* de couro e de carcaça, obtendo as seguintes resistências: 45,3% a amoxicilina/ácido clavulânico; 32,1% a tetraciclina; 32,1% a estreptomicina; 20,8% a sulfonamida; 15,1% a ampicilina; 15,1% a ampicilina/sulbactam; 15,1% a cloranfenicol; 7,5% a gentamicina e 3,8% a trimetoprim/sulfametoxazol. Nenhuma amostra foi resistente a ceftriazol, ciprofloxacina, enrofloxacina e levofloxacina.

O perfil de resistência a antimicrobianos encontrado por Sorensen et al. (2002), nos 15 isolados de *Salmonella*, foi que 8 isolados de carne moída foram sensíveis a todos os antimicrobianos. Os isolados que apresentaram resistência tenderam a ser resistentes a vários antimicrobianos. Os isolados de *S. Anatum*, *S. Heidelberg* DT7, *S. Montevideo* e *S. Typhimurium* var. Copenhagen DT1 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Os isolados *S. Heidelberg* DT10 foram resistentes a estreptomicinas e tetraciclina. Duas cepas de *S. Typhimurium* não DT104 isoladas foram resistentes a oito e nove antimicrobianos: ampicilina, cefalotin, cloranfenicol, canamicina, estreptomicina, tetraciclina, ticarcilina e trimetoprim/sulfametoxazol com ou sem resistência a sulfametoxazol, respectivamente.

Em um estudo realizado por McEvoy et al. (2003), no período de junho de 1998 a maio de 1999, foram isoladas 18 cepas de *S. Dublin* de carcaças bovinas sendo cinco dessas resistentes a estreptomicina.

As 286 amostras de *Salmonella* obtidas em um estudo realizado no Senegal apresentaram um perfil de 62% de resistentes a nitrofuranos. Os padrões de resistência foram baixos para estreptomicina (22%), sulfametoxazol (15%), espectinomicina (1%), cloranfenicol (1%) e tetraciclina (0,4%). Aproximadamente 16% das cepas foram multiresistentes a duas ou mais famílias de antimicrobianos. Nesse estudo encontrou-se 10 perfis de resistência a antimicrobianos (STEVENS, A. et al., 2006).

1.3.4 *Escherichia coli* em carcaças bovinas

Os coliformes termotolerantes são microrganismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária de alimentos e água. A análise em alimentos de microrganismos indicadores pode fornecer informações úteis para prever a possibilidade de contaminação por patógenos. Em abatedouros – frigoríficos de bovinos, a análise de microrganismos indicadores antes e após intervenções feitas em carcaças pode ser útil para verificar a eficácia dos processos utilizados para evitar a contaminação por patógenos. A análise de microrganismos indicadores também pode fornecer informações úteis na avaliação das condições higiênicas do abatedouro – frigorífico. O Serviço de Inspeção e Segurança dos Alimentos dos EUA exige que cada abatedouro – frigorífico bovino realize frequentemente, uma análise quantitativa de *Escherichia coli* biótipo I em carcaças e utilize os resultados dessa análise para orientar na manutenção das condições higiênicas durante o processo de abate (RUBY, J. R. et al., 2009).

Em condições normais de processamento no abatedouro – frigorífico, a remoção do couro de animais saudáveis apresenta uma superfície de carcaça que é considerada essencialmente estéril. Em pouco tempo, com o decorrer do processamento, a carcaça se tornará contaminada, em diferentes graus, com microrganismos. A fonte de maior contaminação microbiana é as fezes do couro e dos pelos dos animais. A contaminação microbiana de carcaças é amplamente atribuída à contaminação com fezes do couro, do pelo, ou ruptura do intestino. A contaminação de carcaças com fezes pode ser visível ou invisível, mas em ambos os casos, sempre há a presença de bactérias. O trato intestinal é considerado o principal reservatório, e as fezes animais a principal forma de transmissão de diversas bactérias entéricas patogênicas, incluindo *Escherichia coli* O157:H7 e outras *E. coli* verotoxigênicas (SIRAGUSA, G. R. et al., 1998)

Sofos et al. (1999) encontraram uma correlação entre a prevalência de *Salmonella* e a contagem de coliformes. Com o aumento na contagem de coliformes, houve um aumento na possibilidade de isolamento do patógeno, o que serviu como indicador da presença de *Salmonella*.

Philips et al. (2001) encontraram uma prevalência de 10,3% de *Escherichia coli* em um total de 1.275 carcaças bovinas.

Atualmente, o Serviço de Inspeção e Segurança dos Alimentos Americano requer uma rotina de determinação de contagem *Escherichia coli* como um critério de controle dos processos e das operações em um Sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (FSIS, 1996). Sendo que o MAPA, atualmente, segundo a Circular nº 175 de 2005, estabelece para enumeração de *E. coli* o valor máximo de 10^2 UFC/cm² em carcaças bovinas, sendo este o mesmo padrão que a legislação dos Estados Unidos adota para este microrganismo.

CAPÍTULO 2

2.1 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo são apresentados na forma de um artigo científico. O subtítulo deste capítulo corresponde ao artigo formatado de acordo com as orientações do **Journal of Food Protection**, onde ele será submetido para publicação.

2.1.1 Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. Isolated from Beef Carcasses in a Brazilian Exporter Slaughterhouse

Prevalence of *Salmonella* in beef carcasses

Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. Isolated from Beef Carcasses in a Brazilian Exporter Slaughterhouse

Fabiana F. Pacheco da Silva^{1*}, Mariana B. Horvath¹, Juliana G. Silveira¹, Luiza Pieta¹ and Eduardo C. Tondo¹

¹ Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - ICTA/UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP 91501-970, Caixa Postal 15090, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Key words: *Salmonella*, beef carcasses, antimicrobial susceptibility

*Author for correspondence. Tel: +55 (51) 3308-6677; Fax: +55 (51) 3308-7114

E-mail: fabip@terra.com.br

ABSTRACT

Brazil is the leading exporter of beef worldwide. The quality and safety of the meat products are essential conditions to remain as an exporter in the very competitive international market. Currently, microbiological criteria are used to evaluate meat products, and *Salmonella* has been considered an important microorganism for many countries. In this study, a total of 120 carcasses were analyzed in three different steps of the process in an exporter slaughterhouse of Southern Brazil. Beef carcasses were swab sampled and the samples were analyzed for *Salmonella* by ISO recommended methods and for *E. coli* by Petrifilm[®]. The *Salmonella* isolates were also examined for antimicrobial susceptibility using 15 drugs. Results demonstrated that four carcasses (3.3%) were positive for *Salmonella*, and all these samples were collected on the animal hides. *Salmonella* was not found in the samples collected at the other slaughter line steps. *Salmonella* isolates (n=6) sampled were classified in three different serovars: S. Newport (n=3), S. Saintpaul (n=2) and S. Anatum (n=1). None *Salmonella* strains exhibited resistance to any of the antimicrobials tested. The most contaminated point with *E. coli* was the first (animal hide) that showed counts ranging from 0.31 to 5.07 log CFU/100 cm². A significant reduction of the *E. coli* counts was observed among the first and the other two points. Results indicated that the risk of contamination of the carcasses still exists, mainly from the hides, but the implementation of Good Manufacturing Practices and HACCP principles are important to avoid microbial contamination.

Currently, according to United States Department of Agriculture, Brazil is the leading exporter of beef in the world (18). Due to its importance in the international market, the quality and safety standards of Brazilian beef have to meet well established international requirements. Red meat has frequently been tested against the presence of *Salmonella* and *Escherichia coli* counts, because these microorganisms have been used as food quality and safety indicators in many countries, including the United States of America that established the criteria of maximum 2.7% of *Salmonella* for cow and bull carcasses tested per set and, required the quantitatively analysis carcasses at a specified frequency for *Escherichia coli* biotype I and use results of this indicator bacteria analysis to guide the maintenance of hygienic conditions during slaughter (19).

Salmonella spp. has been reported as the most important contaminant of food and the leading bacterial agent responsible for outbreaks of foodborne diseases in several countries (12). The transmission of *Salmonella* spp. to man, through the animal population, can occur by direct contact with animals in both farms and in slaughterhouses. Most often salmonellosis occurs after ingestion of contaminated animal products (11). In humans, initial symptoms of salmonellosis are nausea and vomit occurring 8-24 hours after ingestion of contaminated food and generally do not persist after the onset of diarrhea. The infections are more likely to remain localized (11).

The European Union found that salmonellosis was the second most important zoonosis in 2005, with an incidence of 38.2 cases per 100,000 population, and meat and meat products are main sources of such contamination (15).

In Brazil, a remarkable increase in the incidence of foodborne salmonellosis caused by *Salmonella* has been reported (10). Among the 6,349 foodborne outbreaks registered in Brazil during 1999 to 2009, *Salmonella* was the most implicated bacterial agent, and was responsible for almost 20.7% of the reported outbreaks (8). Corroborating these data, Surveillance Service

of Rio Grande do Sul State (RS), Southernmost State of Brazil, has reported *Salmonella* as the mainly causative agent of foodborne diseases, responsible for 47.4% (334 outbreaks) of the total of 1037 outbreaks investigated in this State and beef products were the 3rd food most involved in the outbreaks (2).

The increased use of antimicrobial agents in animal production and human medicine as a means of preventing and treating diseases is a significant factor in the emergence of antibiotic-resistant *Salmonella*. Therefore, resistant *Salmonella* developed as a result of antibiotic use in animal production can be transferred to humans through the food chain, being a problem to be considered. Contamination of food with antibiotic-resistant bacteria can be a major threat to public health, causing community outbreaks of infectious diseases (3).

The aim of this study was to determine the occurrence and the antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. and the contamination of *E. coli* in beef carcasses during the process in a Southern Brazilian exporter slaughterhouse.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. The samples were taken in an exporter slaughterhouse located in RS State, regulated by the Brazilian Federal Inspection Service. The abattoir slaughtered approximately 200 animals daily and the slaughter was done mainly in the morning. The collections were previously scheduled and did not change the routine of the slaughterhouse. The carcasses chosen to be sampled were the first processed in the slaughterhouse in each collection day. The number of the carcasses and the origin of the animals sampled in each collection day are showed in the Table 1. During the period of September 2009 to June 2010 thirteen samplings were carried out analyzing a total of 120 carcasses. The samples were swab collected of the surface (hide and carcasses) in three different points of the process in the slaughterhouse (Figure 1). The first collection point (P1) was the animal hide after bleeding

but before hide opening and subsequent hide removal. The second collection point (P2) was the carcass after the hide removal but before the evisceration. The last collection point (P3) was the carcass after the division in half-carcass but before the last toilet.

Each carcass was sampled on four regions of 100 cm² of the brisket in each one of the three different points. Plain cellulose washing-up sponges (5 x 7 cm; 0.2 cm thickness) containing no antimicrobial additives were sterilized by autoclaving for 15 min to 1 atm and used for the sampling. Just before sampling, each cellulose sponges was moistened with 10 ml of sterile saline peptone solution (0.1% bacteriological peptone; 0.85% NaCl) and then placed in a sterile plastic bag. The carcasses were sponge-swabbed by ten consecutive passes at each of the four collecting places using one cellulose sponge to each sampling region. After the sampling, the four cellulose sponges of each point were placed in the same plastic bag and transported under refrigeration to the Food Microbiology Laboratory of Food Science and Technology Institute (ICTA-UFRGS), within 2 h, to be analyzed.

Homogenization of the samples. After the arrival of cellulose sponges at the Laboratory, each plastic bag containing the four sponges was added with 200 ml of saline peptone solution. The plastic bag outside was repeatedly squeezed manually for 1 min and further decimal dilutions were made with saline solution to carried out the *E. coli* counts.

Enumeration of *Escherichia coli*. The 3M™ Petrifilm™ *E.coli*/Coliform Count Plates were used to enumerate *E. coli*. From each appropriate decimal dilution, 1 ml was removed and then inoculated in a petrifilm plate. The incubation was made for 48 h at 37° C. Blue colonies with gas bubbles were counted.

Isolation of *Salmonella* spp. An aliquot of 40 ml of the saline peptone solution was centrifuged at 1000 G for 15 min and the sediment was used to investigate *Salmonella* spp. presence.

According to ISO 6579:2002 method, each sediment was incubated in buffered peptone water (BPW; Oxoid) for 18 – 24 h at 37° C. Subsequently, 1 ml was transferred to 10 ml of Muller Kauffmann tetrathionate – novobiocin broth (MKTTn; Oxoid) and 0.1 ml was transferred to 10 ml of Rappaport Vassiliadis broth with soya (RVS; Oxoid) and incubated at 37° C and 42.5° C, respectively, for 24 h. Then, both xylose lysine desoxycholate agar (XLD; Oxoid) and mannitol lysine crystal violet brilliant green agar (MLCB; Oxoid) plates were inoculated with aliquots of the cultures from RVS and MKTTn. All the plates were incubated at 37° C for 24 h. Suspect colonies (red with black centre and/or red from XLD; mauve colored colonies with black centre from MLCB) were purified on a nutrient agar. Then, biochemical recommended tests and serology by agglutination with Poly O antisera (Probac) were carried out to confirm the result (13). After these tests, *Salmonella* spp. isolates were forwarded to the Laboratório de Enterobactérias in the Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) for serotyping and phage typing.

Enumeration of *Salmonella* spp. To enumerate *Salmonella* spp., 0.1 ml of the first dilution was spread-plated on xylose lysine desoxycholate agar (Oxoid). The plates were incubated for 24 h at 37° C. Red colonies and red colonies with black centers were counted and later confirmed by biochemical tests.

Antimicrobial susceptibility test. Susceptibility to antimicrobial agents was tested using the disk diffusion method on Muller-Hinton agar (Oxoid) plates according to the Clinical Laboratory Standards Institute (9). The following 15 different antimicrobial agents were examined against *Salmonella* isolates: ampicillin (10 µg), cefoxitin (30 µg), cephalothin (30 µg), cefotaxime (30 µg), imipenem (10 µg), chloramphenicol (30 µg), amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), streptomycin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), tetracycline (30 µg), trimethoprim-sulphamethoxazole (25 µg), and

sulfonamides (300 µg). The diameters zones of inhibition were recorded to the nearest millimeter and classified as susceptible, intermediate, and resistant.

Statistical analysis. *E. coli* and *Salmonella* spp. counts were calculated per 100 cm² and converted to log before statistical analysis. The mean values and standard deviation were calculated and the analysis of variance (ANOVA) and a Tukey Test were carried out to compare the differences between the mean values. The differences were considered significant with *P* values less than α of 0.05. For the *Salmonella* spp. analysis data were reported as percentage of positive samples for the pathogen.

RESULTS AND DISCUSSION

***E. coli* enumeration.** The general mean values of *E. coli* were 2.57, 0.46, and 0.40 log CFU/100 cm² for P1, P2, and P3, respectively. There were significant reductions comparing counts of P1 and P2, and counts of P1 and P3, but no significant difference was observed between counts of P2 and P3. The low counts in P2 and P3 could possibly be explained due to the correct hide removal and, the sampling places are considered the sterile carcass tissue. The significant reduction when compared P1 with the other two points and the low counts observed in P2 and P3 could indicate that good manufacturing practices were adequate during the process in the slaughterhouse.

The counts of *E. coli* on animal hides (P1) ranged from 0.31 to 5.07 log CFU/100 cm² (Table 2). In other study, Arthur et al. (5) had demonstrated higher mean values of *E. coli* on animal hides in two commercial fed-beef processing plants where the counts ranged from 6.6 to 8.0 log CFU/100 cm² in one of the plants, and 4.9 to 5.8 log CFU/100 cm² in the other plant. The microbiological loads of incoming cattle are important because the external hide is a primary source of fecal contamination, which can be eventually transferred to the underlying sterile carcass tissue (7).

The results obtained in the second sampling point showed variations from N.D (not detected) to 2.42 log CFU/100 cm². Arthur et al. (5) reported similar results examining 288 beef carcasses in USA. On the other hand, Bacon et al. (7) found higher mean values ranging from 2.6 to 5.3 CFU/100 cm² analyzing beef carcasses in USA. In the present study, the microbiological loads in P2 probably reflected the extent of the microbiological contamination originated from the hide, once beef carcass surfaces are generally sterile (7).

Analyzing counts obtained in different sampling days, it could be observed that the fifth collection day showed significant higher counts (P1 = 5.07, P2 = 2.42 and P3 = 2.10 log CFU/100 cm²) for all three points, than the other days, while the tenth collection day demonstrated the lowest mean values. No reasons were found for these facts, however it corroborates to the idea that the higher the initial contamination, greater is the contamination of the final product. Another important result observed was the significant increase between P2 and P3 in the ninth collection day. It could possibly be explained for a recontamination after evisceration or another failure in the process.

Results indicated that there was no direct correlation between the level of free chlorine in the water used to wash the animals before slaughter and the mean values observed in P1. As an example, in the first sampling day, mean values of 1.93 log CFU/100cm² were verified with free chlorine levels of 5 ppm in water, however in the twelfth collection day mean value of 2.16 log CFU/100cm² were observed, whilst the level of free chlorine was 0.65 ppm. Even though the chlorine level has varied almost 9 folds, the bacterial counts were not significantly different. These results may indicate that animal washing has limited application and the risk of contamination of the beef carcasses may still exist, if only this kind of practice is used. In order to improve microbiological quality, the use of multiple-sequential interventions, like pre- and post-evisceration water washing, organic acid solution rinsing and hot water washing

could be possible measures to decontaminate beef carcasses during the slaughtering and dressing process (7).

Isolation, enumeration and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. The presence of *Salmonella* spp. was observed in only four carcasses (3.3%), being three of them sampled in the fifth collection and one carcass sampled in the eighth collection. *Salmonella* spp. was only isolated from the animal hides (P1). Reid et al. (16) obtained similar results showing a prevalence of 3.3% of *Salmonella* in 90 beef cattle hides in the South-West of England. A much higher *Salmonella* prevalence (94.8%) was found by Arthur et al. (4) analyzing 288 beef cattle hides in the United States of America. In opposite, Antic et al. (1) were not able to isolate *Salmonella* spp. in any of the 40 animal hides sampled in one abattoir in Serbia. The difference between the frequency of *Salmonella* in this study and others found in the literature could be explained by multiple factors. Firstly, the cattle slaughtered had different origins in some collection days, coming from different farms that could easily have had differences in the prevalence of pathogen. Secondly, the kind of animal exploration more prevalent in Brazil is the extensive farming where the direct contact among the animals is very small. This practice helps to avoid the transmission of *Salmonella* among the animals. There are other factors that could explain the *Salmonella* frequency, including those related to the animals, the lairage and the environment.

Unlike of the animal hides, there was no *Salmonella* spp. in any of the other two points analyzed in our study, and these results were similar with those found by Meyer et al. (14) when examined 841 beef carcasses in Germany. The absence of *Salmonella* in P2 and P3 and the low *E. coli* counts in this points demonstrated that the hygienic conditions and the good manufacturing practices of the slaughterhouses were adequate.

Six strains of *Salmonella* spp. were isolated in the present study, and they were classified in three different serovars. The most prevalent serovar was *S. Newport* being found

in three animals. The serovar *S. Saintpaul* was found in two animals, while *S. Anatum* was identified in only one animal.

It was not possible to enumerate *Salmonella* spp. in the majority of the samples. This fact may have occurred because *Salmonella* was not present on the sampled surfaces or due to the amount of *Salmonella* present was too low to be detectable. Other possibilities to explain this result is the influence of background flora that could inhibit *Salmonella* multiplication, giving a false – negative result or the low sensitivity of the method used to detect stressed cells (14).

All the *Salmonella* spp. stains were susceptible to the 15 antimicrobials tested. This result is different of those observed by Bacon et al. (6) who have reported 8 *Salmonella* strains isolated of four animal hides resistant to eight antimicrobials, including ampicillin, chloramphenicol, gentamicin, sulfonamides, tetracycline and others.

The level of free chlorine in the water used to wash the animals in the fifth and in the eighth collection days was 2.01 ppm and 1.85 ppm, respectively, being very similar. However the mean value of *E. coli* in the fifth collection was significantly higher than the mean value of *E. coli* in the eighth collection ($P < 0.05$). These results indicate that the correlation between high levels of coliforms and the prevalence of *Salmonella* spp. is not always direct. Ruby et al. (17) have suggested the relation will be better if the absence of *Salmonella* spp. were based on *Enterobacteriaceae* count - negative results.

In the present study, *Salmonella* spp. was found on animal hides but not in the final product, suggesting that adequate slaughter procedures were carried out in the slaughterhouse analyzed. However, the presence of considerable high counts of *E. coli* on the animal hides and the transference of these microorganisms to the carcasses indicated that the risk of the contamination still exists. Aiming to prevent such contamination and foodborne pathogens, correct use of carcass decontamination techniques and the improvement of Good

Manufacturing Practices and HACCP system may be used. These tools also can help the meat industry to meet established microbiological performance criteria and persist in the competitive meat market.

REFERENCES

1. Antic, D., B. Blagojevic, M. Ducic, et al. 2010. Distribution of microflora on cattle hides and its transmission to meat via direct contact. *Food Control*.21: 1025 – 1029.
2. ANVISA. 2000. Relatórios anuais de ETA. ANVISA, Porto Alegre, RS.
3. Arslan, S., and A. Eyi. 2010. Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products. *J. Food. Prot.* 73: 1613 – 1617.
4. Arthur, T. M., J. M. Bosilevac, et al. 2007. Effects of a minimal hide wash cabinet on the levels and prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on the hides of beef cattle at slaughter. *J. Food. Prot.* 70: 1076 – 1079.
5. Arthur, T. M., J. M. Bosilevac, et al. 2004. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. *J. Food. Prot.* 67: 658 – 665.
6. Bacon, R. T., J. N. Sofos, et al. 2002. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from beef animal hides and carcasses. *J. Food. Prot.* 65: 284 – 290.
7. Bacon, R. T., K. E. Belk, et al. 2000. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple – sequential interventions for decontamination. *J. Food. Prot.* 63: 1080 – 1086.
8. BRASIL. 2010. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2009. Ministério da Saúde, Porto Alegre, RS.
9. CLSI. 2010. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M02-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

10. Fuzihara, T. O., S. A. Fernandes, and B. D. Franco. 2000. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. *J. Food. Prot.* 63: 1749 – 1753.
11. Jay, J. M. 2005. Modern food microbiology. Artmed, Porto Alegre.
12. Laconcha, I., D. L. Baggesen, et al. 2000. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4,6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. *Vet. Microbiol.* 75: 155 – 165.
13. Mac Faddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
14. Meyer, C., S. Thiel, U. Ullrich, and A. Stolle. 2010. *Salmonella* in raw meat and by – products from pork and beef *J. Food. Prot.* 73: 1780 – 1784.
15. Norrung, B., and S. Buncic. 2008. Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Sci.* 78: 14 – 24.
16. Reid, C. –A., A. Small, S. M. Avery, and S. Buncic. (2002) Presence of food-borne pathogens on cattle hides. *Food Control* 13: 411 – 415.
17. Ruby, J. R., and S. C. Ingham. 2009. Use of *Enterobacteriaceae* analysis results for predicting absence of *Salmonella* serovars on beef carcasses. *J. Food. Prot.* 72: 260 – 266.
18. USDA. 2009. Cattle and beef data and statistics . USDA, Washington, DC.
19. U.S. Department of Agriculture, Food and Safety and Inspection Service. 1996. Pathogen reduction; hazard analysis and critical control point (HACCP) systems; final rule. Available at: http://www.fsis.usda.gov/OA/fr/haccp_rule.htm. Accessed 25 November 2010.

TABLE 1. *Number of carcasses sampled and city of origin of the animals in each collection day in a Brazilian Southern Slaughterhouse*

Sampling Day	Number of carcasses sampled	City of origin of the animals
1	4	Tupanciretã, Monte Alegre dos Campos and Julio de Castilhos
2	7	Capão Bonito do Sul and Vacaria
3	10	_____ ^a
4	9	_____ ^a
5	10	Bom Jesus
6	10	Bom Jesus
7	10	São Luiz Gonzaga and Aceguá
8	10	São José dos Ausentes
9	10	São José dos Ausentes, Bom Jesus and Monte Alegre dos Campos
10	10	Vale Verde and Caxias do Sul
11	10	Dom Pedrito and Jaquirana
12	10	São José dos Ausentes, Caxias do Sul, Boa Vista do Cadeado and Vacaria
13	10	Caxias do Sul, Nova Roma do Sul and Santiago
Total	120	_____ ^b

^a Information was not provided by the slaughterhouse.

^b Information not calculated.

TABLE 2. Means values of *E. coli* and free chlorine in water in three points of the slaughter line in one slaughterhouse of Southern Brazil

Sampling day	Sampling points (log CFU/100 cm ²) ^d			Level of free chlorine in water (ppm)
	P1	P2	P3	
1	1.93 ^a	0.97 ^a	N.D ^b	5
2	2.98 ^a	N.D ^b	0.25 ^b	0.54
3	4.11 ^a	0.93 ^b	0.93 ^b	0.42
4	3.34 ^a	0.42 ^b	0.32 ^b	4.3
5	5.07 ^a	2.42 ^b	2.10 ^b	2.01
6	2.18 ^a	0.40 ^b	0.18 ^b	0.62
7	3.35 ^a	0.36 ^b	0.26 ^b	2.65
8	2.27 ^a	0.10 ^b	N.D ^b	1.85
9	2.20 ^a	0.11 ^b	0.94 ^c	*
10	0.31 ^a	N.D ^a	N.D ^a	*
11	1.39 ^a	N.D ^b	N.D ^b	5
12	2.16 ^a	0.23 ^b	0.11 ^b	0.65
13	2.11 ^a	0.04 ^b	0.18 ^b	3.80
General Mean Value	2.57 ^a	0.46 ^b	0.40 ^b	_____ ^e
Standard Deviation	1.21	0.67	0.60	_____ ^e

^d Means in the same line that do not share a common letter (a through c) are significant different by Tukey Test (p<0.05).

^e Value not calculated.

* The level of chlorine was not provided by the slaughterhouse.

N.D - not detected (To calculate the mean values was considered 1 UFC, so log 1=0)

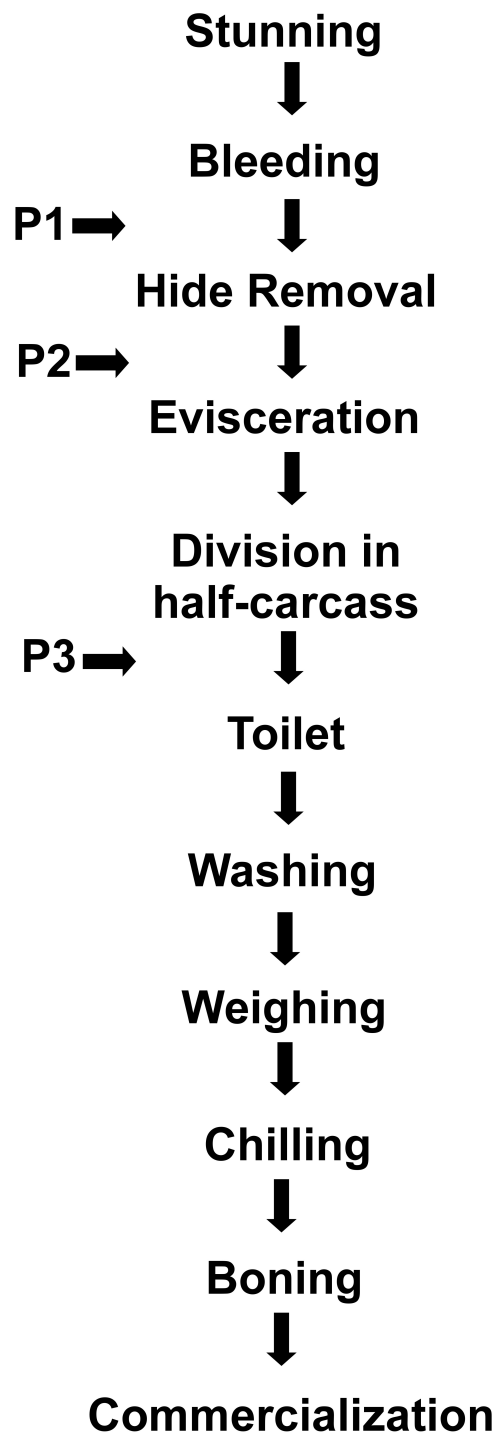


Figure 1 - Slaughter line of a Brazilian exporter slaughterhouse. Horizontal arrows indicate the localization of the three collection points. P1 - first collection point. P2 - second collection point. P3 - third collection point.

CAPÍTULO 3

3.1 DISCUSSÃO GERAL

Atualmente; o Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina do mundo, sendo o líder mundial na exportação desse produto, o que faz deste negócio um dos principais do país. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), o Brasil exportou 1,494 milhões de toneladas de carne bovina até outubro de 2010 e movimentou US\$ 4,1 bilhões para a economia nacional.

A qualidade e a segurança dos produtos cárneos são importantes exigências do mercado internacional e, um dos principais critérios utilizados para avaliar a segurança dos alimentos é a investigação de microrganismos patogênicos. Um dos principais agentes bacterianos investigados, cuja ausência é exigida pela maioria dos países importadores de produtos cárneos brasileiros, é *Salmonella* spp. Segundo o Regulamento (CE) Nº 2073/2005, a ausência de *Salmonella* é um dos critérios microbiológicos exigidos para a comercialização de carcaças bovinas com a Comunidade Europeia. No Brasil, a RES-12/2001 do Ministério da Saúde estabelece o mesmo critério que a União Européia para a comercialização desse tipo de produto no mercado nacional.

Salmonella é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no mundo e pode causar enterite (salmonelose), febre entérica (febre tifóide) e septicemia (ARSLAN, S.; EYI, A., 2010). *Salmonella* foi a segunda causa de infecção mais relatada em humanos na União Européia no ano de 2005, chegando a uma incidência de 38,2 casos a cada 100.000 habitantes da população (NORRUNG, B.; BUNCIC, S., 2008). Depois da campilobacteriose, a salmonelose foi a segunda causa mais importante de enterite bacteriana em humanos na Alemanha (MEYER, C.; THIEL, S.; ULLRICH, U.; STOLLE, A., 2010). No Brasil, o número de casos de salmonelose vem aumentando; durante os anos de 1999 a 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária relatou a *Salmonella* como o agente causal mais envolvido em surtos alimentares, responsável por 20,7% dos 6.349 surtos relatados (BRASIL, 2010).

Em torno de 80 a 90% dos casos de salmonelose em países industrializados são relacionados ao consumo de produtos de origem animal (MEYER, C.; THIEL, S.; ULLRICH, U.; STOLLE, A., 2010). Carne e seus derivados são fontes importantes desse tipo de infecção, mas o conhecimento exato de o quão importante eles são,

comparando-os com outros tipos de alimentos e fontes, é ainda limitado. A União Europeia estimou que, dentre os 25.760 surtos de salmonelose ocorridos em 2005, apenas em 0,3% a causa foi carne bovina (NORRUNG, B.; BUNCIC, S., 2008). Já no Brasil, a carne bovina foi o 3º alimento mais envolvido em surtos alimentares no estado do Rio Grande do Sul (RELATÓRIOS ANUAIS, SES/DVS/RS, 2000).

No presente estudo, avaliou-se 120 carcaças bovinas em um abatedouro-frigorífico com inspeção federal, localizado na região da serra do Estado do Rio Grande do Sul. Essa pesquisa faz parte de um projeto que está propondo a implantação de um Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para Avaliação de Riscos Microbiológicos em Produtos de Origem Animal (CDA – ARMPOA). Tal projeto visa subsidiar o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento e o setor produtivo na tomada de decisões em relação ao comércio da carne bovina brasileira.

A avaliação de risco é um dos elementos da análise de risco que, segundo o Acordo de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias da OMC, é a ferramenta indicada para proteger a saúde dos consumidores e garantir práticas eqüitativas no comércio nacional e internacional. Além dessa etapa, a Análise de Risco é composta também pela gestão do risco avaliado e a comunicação do risco às partes interessadas (OMC, 2006).

A avaliação de risco, especificamente, é um processo de base científica, constituído de quatro etapas: 1º) identificação do perigo, 2º) caracterização do perigo, 3º) avaliação da exposição e 4º) caracterização do risco. A identificação e caracterização do perigo dependem de dados sobre prevalência, nível de contaminação e características de virulência do perigo considerado. A avaliação da exposição estima o número real dos perigos microbiológicos no alimento no momento do consumo, baseando-se em modelos preditivos matemáticos que integram dados sobre multiplicação, sobrevivência, inativação dos microrganismos a diferentes condições ambientais, recontaminação e quantidade de alimento consumido. Por fim, a caracterização do risco envolve a integração dos resultados da identificação do perigo, caracterização do perigo e avaliação da exposição para obter uma estimativa do risco (OMC, 2006).

No presente estudo, a avaliação de risco, mais especificamente a identificação do perigo, focou *Salmonella* spp. durante o processo de abate de bovinos em três pontos diferentes da linha de abate. Além da pesquisa desse

patógeno, realizou-se a enumeração de *E. coli*, as quais são microrganismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária da água e dos alimentos. Esses microrganismos indicadores têm sido muito utilizados devido a sua correlação com a presença dos patógenos. Diversos países, incluindo os Estados Unidos, adotaram a pesquisa de *E. coli* como um parâmetro importante no controle dos processos e das operações em um Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (FSIS, 1996).

No presente estudo, as contagens de cada ponto coletado demonstraram valores bastante variáveis, mas que apresentaram uma média de 2,57; 0,46; e 0,40 log UFC/100 cm² para o P1, P2, e P3, respectivamente. Houve reduções significativas quando as contagens de P1 foram comparadas com as do P2 e de P1 com o P3, mas o mesmo não foi observado quando comparadas as contagens de P2 e P3. As altas contagens no primeiro ponto de coleta podem ser explicadas pelo fato do local de amostragem ser o couro animal, que ainda está contaminado com fezes, poeira, terra, entre outras sujidades. As baixas contagens de P2 e P3 podem ser justificadas devido à remoção do couro de forma apropriada e, o local de amostragem ser o tecido muscular considerado estéril.

A ausência de uma diferença estatisticamente significativa entre o P2 e o P3 pode sugerir que não houve recontaminação durante o processo de abate, exceto na nona coleta, onde foi observado um aumento significativo da contagem de *E. coli* do P2 para o P3, que pode ser explicado por uma provável contaminação após a etapa de evisceração das carcaças ou outra falha no processo.

As contagens de *E. coli* no primeiro ponto de coleta foram inferiores aos encontrados por Bacon et al. (2000), que obtiveram contagens de 5,5 a 7,5 log UFC/100 cm² analisando 1.280 carcaças bovinas nos Estados Unidos da América (EUA) e; aos demonstrados por Arthur et al. (2004), que obtiveram contagens que foram de 6,6 a 8,0 log UFC/100 cm² em uma planta e de 4,9 a 5,8 log UFC/100 cm² em outra planta analisando ao total 288 carcaças também nos EUA. Esses resultados demonstraram que as condições higiênico-sanitárias iniciais do abate eram adequadas e, reforçam a importância de uma contaminação inicial baixa dos animais, pois o couro animal é uma das primeiras fontes de contaminação fecal, a qual pode ser transferida para o produto final.

Os resultados encontrados no segundo ponto de coleta corroboram os encontrados por Arthur et al. (2004), que obtiveram valores de contagens de 0,7 a 2,5 log UFC/100 cm², quando analisou duas plantas comerciais de processamento de carne bovina.

No presente estudo, as coletas que apresentaram os maiores e os menores níveis de contaminação para os três pontos amostrados foram a 5^a e a 10^a, respectivamente. Nenhuma explicação foi encontrada para este fato, mas este resultado corrobora a idéia de que quanto mais alta a contaminação inicial dos animais, maior será a contaminação no produto final.

As práticas utilizadas para diminuir a contaminação no couro animal não foram completamente adequadas, pois não foi observada uma correlação entre os valores das contagens de *E. coli* e os níveis de cloro livre encontrados na água utilizada no banho de aspersão dos animais, antes do abate. Não foi observada uma diferença estatística entre as contagens do P1 na primeira e na décima segunda coleta, mas os níveis de cloro livre no banho de aspersão nesses dias foram 5 e 0,65 ppm, respectivamente. Esse fato pode indicar uma aplicação limitada dessa prática, se não houver o devido controle do nível de cloração e caso não haja uma fonte de água potável que possa ser utilizada para o banho de aspersão dos animais. Essa inadequação pode levar a persistência do risco de contaminação das carcaças bovinas durante o processo. A melhoria da qualidade microbiológica deve ser associada a outras práticas de descontaminação das carcaças como, por exemplo, a lavagem das carcaças com ácidos orgânicos (BACON, R. T. et al., 2000).

A prevalência de *Salmonella* spp., neste estudo, foi de 3,3% (4), sendo este patógeno encontrado em 3 carcaças da 5^a coleta e em 1 carcaça da 8^a coleta. Nestas duas coletas, observou-se um nível de cloro na água do banho de aspersão muito similar, sendo de 2.01 ppm na quinta e de 1.85 ppm na oitava coleta, mas houve uma diferença significativa nas contagens de *E. coli*, sendo os valores médios apresentados na 5^a coleta superiores aos demonstrados na 8^a coleta. Este fato pode indicar que a correlação entre altos níveis de coliformes e a presença deste patógeno não é sempre direta.

A utilização de *Enterobacteriaceae*, por exemplo *E. coli*, como microrganismo indicador das condições higiênico – sanitárias das carcaças bovinas já é bem aceita, contudo, ainda há dúvidas quanto a sua utilização para indicar uma provável

contaminação por patógenos. Essa baixa aceitação, possivelmente, seja resultado de diferenças metodológicas aplicadas nas análises de pesquisa dos patógenos e dos indicadores. A utilização da pesquisa de microrganismos indicadores, como um método preditivo para a presença de patógenos, funcionará bem, se os métodos tiverem sensibilidades comparáveis (RUBY, J. R.; INGHAM, S. C., 2009). Em um estudo realizado por Ruby et al. (2007) foi observado que a porcentagem de animais que apresentaram contagens de *Enterobacteriaceae* e não foram positivos para *Salmonella* foi de (43,3%), sendo considerado um valor alto e que não suportaria uma tomada de decisão baseada em resultados positivos para *Enterobacteriaceae*. Esse fato poderia levar a conclusão errada, quanto a assumir que as carcaças contaminadas por *Enterobacteriaceae* estariam também contaminadas por *Salmonella* spp. Em um estudo realizado por Ruby et al. (2009) foi observado que uma melhor relação foi estabelecida, quando foram utilizados resultados negativos para *Enterobacteriaceae* e resultados negativos para *Salmonella*. O número de animais que apresentaram resultados negativos para ambos os microrganismos foi de 98%. Esse fato sugere que, esta relação de ausência de *Enterobacteriaceae* e ausência de *Salmonella*, seria a melhor associação para a utilização desse tipo de análise de predição.

Na presente pesquisa foi observada que a porcentagem de carcaças que apresentaram mais de 2 log UFC/100 cm² de *E. coli* e presença de *Salmonella* foi de 3,37%, enquanto que, a porcentagem de carcaças que apresentaram este patógeno e contagens de *E. coli* inferiores a 2 log UFC/100 cm² foi de 3,23%. Estes valores não apresentam uma diferença estatisticamente significativa e demonstram, novamente, que uma relação entre a enumeração de *E. coli* e a presença de *Salmonella* pode não ser diretamente proporcional.

Todas as cepas de *Salmonella* spp. obtidas foram isoladas do couro animal, não sendo nenhuma delas proveniente das carcaças. Esses resultados corroboram aqueles encontrados por Reid et al. (2002) que obtiveram uma prevalência do patógeno de 3,3% quando analisou 90 amostras de couro bovino no sudoeste da Inglaterra. Outros pesquisadores, como Arthur et al. (2007) observaram uma prevalência maior, encontrando 94,8% das 288 amostras de couro contaminadas por *Salmonella* nos Estados Unidos.

A ausência de *Salmonella* spp. no produto final é um indicativo de que ele estará adequado para o consumo e não representará nenhum risco à saúde do consumidor, por esse patógeno. Dessa forma, o produto final estará de acordo com a legislação vigente do País, a qual exige ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de produto (BRASIL, 2001).

No total, foram isoladas seis cepas de *Salmonella* spp., classificadas em apenas três sorovares. O sorovar mais prevalente foi *S. Newport*, o qual foi encontrado em três carcaças; seguido do sorovar *S. Saintpaul*, que foi isolado em duas carcaças e, o sorovar *S. Anatum*, encontrado em apenas uma carcaça. Como mencionado anteriormente, dentre as quatro carcaças que apresentaram *Salmonella*, três delas foram da 5ª coleta e apenas uma carcaça pertencia a 8ª coleta. Das carcaças da 5ª coleta; duas apresentaram, cada uma delas, o sorovar *S. Newport* e, a outra carcaça apresentou o sorovar *S. Saintpaul*. A carcaça positiva da 8ª coleta apresentou os três tipos de sorovares isolados neste estudo (*S. Newport*, *S. Saintpaul* e *S. Anatum*).

Um resultado que merece destaque foi o isolamento do sorovar *S. Saintpaul*, o qual ainda é pouco isolado em bovinos no Brasil e no mundo. Este sorovar já foi encontrado em solos de currais pré-abate de bovinos em uma pesquisa realizada por Motsoela et al. (2002), quando foram analisadas 250 amostras ambientais em um abatedouro-frigorífico em Botsuana. Nos Estados Unidos, este sorovar foi isolado em apenas 0,31% dos 320 couros bovinos analisados (BACON, R. T. et al. 2002).

S. Saintpaul tem sido mais encontrado em outras espécies animais. Duffy et al. (2009) analisaram 121 carcaças de cabras, na Austrália, e obtiveram 44 isolados de *Salmonella* spp., sendo o sorovar *S. Saintpaul* o mais prevalente, encontrado em 25% dos isolados. Mikolajczyk et al. (2002) observaram que o sorovar *S. Saintpaul* foi o terceiro mais prevalente (22,45%) dentre os 98 isolados de *Salmonella* spp., obtidos em 400 carcaças de frango provenientes da Polônia.

O sorovar *S. Saintpaul* é considerado emergente, pois vem aumentando o número de relatos de surtos alimentares causados por ele. Em 2001, o departamento de saúde pública do estado de Massachusetts, nos Estados Unidos, reportou um surto alimentar envolvendo 26 pessoas que haviam consumido mangas contaminadas por *S. Saintpaul* (BEATTY, M. E. et al. 2004). No ano de 2005; cinco

surtos associados a este sorovar foram relatados em três diferentes Estados do Estados Unidos e, o alimento envolvido em todos os surtos foi um suco de laranja não pasteurizado, produzido por uma empresa que não seguia o regulamento do Food and Drug Administration (FDA) para a produção deste tipo de alimento (JAIN, S. et al. 2009).

O sorovar *S. Saintpaul* tornou-se ainda mais importante em 2008, quando o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), nos Estados Unidos, relatou um dos maiores surtos de salmonelose, nos últimos anos, causado por este agente. Este surto envolveu 1.442 pessoas doentes em 43 estados dos EUA, durante o período de 16 de abril a 11 de agosto de 2008. Não houve mortes neste surto. A fonte de infecção foi dois tipos de pimenta (Jalapeño e Serrano), que eram produzidas em fazendas do México. Durante a investigação do surto pelo CDC, o agente causal foi isolado, tanto de amostras dos produtos nas fazendas mexicanas quanto nas fontes de água de irrigação da produção das pimentas. Devido a este fato, o FDA aconselhou aos consumidores americanos a não ingerirem esses dois tipos de pimenta provenientes do México e, ressaltou a importância de cozinhar os vegetais para que *Salmonella* fosse eliminada (CDC, 2008).

Outro importante surto envolvendo o sorovar *S. Saintpaul* ocorreu em 2009, envolvendo brotos de alfafa produzidos em instalações com múltiplas sementes que, provavelmente se originaram de um único produtor. Neste caso, o número de doentes chegou a 228 pessoas de 13 estados do Estados Unidos. Durante a investigação do surto, a recomendação do CDC e do FDA foi que os americanos não consumissem brotos de alfafa crus e nem misturas que contivessem brotos de alfafa, até que houvesse uma nova orientação dos órgãos fiscalizadores. Após o início do surto, o FDA alertou os produtores de brotos e os varejistas, que um distribuidor de sementes havia se retirado, voluntariamente, do mercado. Após a investigação concluída, o FDA voltou a ressaltar a importância do consumo exclusivamente de brotos bem cozidos (CDC, 2009)

O isolamento do sorovar *S. Saintpaul* e dos outros sorovares no couro animal indica que o risco de contaminação ainda existe, pois este local é considerado uma das principais fontes de contaminação do produto final. Devido a existência do risco de contaminação, o controle neste ponto do processo e a adoção de medidas de Boas Práticas de Fabricação devem ser realizados de forma adequada.

A enumeração de *Salmonella* spp. foi um fator limitante neste estudo. O método do plaqueamento direto em ágar XLD mostrou-se pouco adequado para a enumeração bacteriana. Este fato pode ser explicado de várias maneiras como, por exemplo, a real inexistência de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas, a quantidade encontrada do microrganismo foi tão baixa que não pode ser detectada, a presença de uma flora competidora que impossibilitou a multiplicação da *Salmonella* spp. ou a baixa sensibilidade do meio para detectar células estressadas (MEYER, C. S. et al. 2010)

Neste estudo, nenhum dos isolados de *Salmonella* spp. apresentou resistência a qualquer um dos 15 antimicrobianos testados. Esse resultado difere dos encontrados por Bacon et al. (2002), que obtiveram 49 isolados de *Salmonella* spp. analisando 320 amostras de couro bovino em um estudo realizado no estado do Colorado nos Estados Unidos e, dentre esses isolados, 69,4% apresentou resistência a pelo menos um antimicrobiano testado. Stevens et al. (2006) verificaram que, de 99 isolados de *Salmonella* spp. provenientes da análise de 236 carcaças bovinas de um abatedouro-frigorífico no Senegal, a porcentagem de resistência foi de 36,7% a nitrofuranos, 21,1% a sulfametoxazol, 14,1% a estreptomicina, 2% a cloranfenicol, 1,0% a ácido nalidíxico e 1,0% pefloxacina. Arslan et al. (2010) analisaram 75 carcaças bovinas, na Turquia, e obtiveram 12 isolados de *Salmonella* spp, sendo o perfil de resistência apresentado por eles: 100% a cefazolina, 91,7% a amoxicilina/ácido clavulânico, 83,3% a ampicilina, 41,7% a carbenicilina, 25% a cefuroxima, 16,7% a tetraciclina, 8,3% a amicacina, 8,3% a cloranfenicol e 8,3% a sulfametoxazol – trimetoprim.

A diferença entre o perfil de resistência observado neste estudo e aos outros reportados na literatura pode ser explicada por alguns fatores, sendo o tipo de exploração dos animais um deles. A criação extensiva de bovinas e a forma predominante de exploração no Brasil. Neste tipo de criação, na maioria das vezes, a utilização de antimicrobianos é baixa, portanto ocorre a ausência da seleção de cepas resistentes. Diferentemente; do que ocorre em outras espécies animais como, por exemplo, os suínos, que possuem uma criação intensiva. Neste tipo de criação, devido à intensificação dos métodos de produção, acabaram surgindo uma série de doenças relacionadas com as tecnologias introduzidas. Para o controle dessas enfermidades, assumiram um papel muito importante a utilização de

antimicrobianos. A função deles tem sido restabelecer o equilíbrio perdido, criando condições necessárias para uma suinocultura mais lucrativa. Cepas de *Salmonella* isoladas de suínos, na maioria das vezes, apresentam altos percentuais de resistência. Castagna et al. (2001) analisaram 99 cepas de *Salmonella* isoladas de suínos e obtiveram o padrão de resistência de: 83,9% a sulfonamida; 37,4% a tetraciclina; 25,2% a cotrimoxazol e 20,2% a ampicilina.

A sensibilidade a todos os antimicrobianos demonstrada por todos os isolados de *Salmonella* spp. obtidos neste estudo indica que, eles ainda não representam um grande problema para a terapêutica antimicrobiana. Diferentemente, de sorovares de *Salmonella* spp. multiresistentes como, por exemplo, o *S. Typhimurium* DT104.

De modo geral, os resultados obtidos neste estudo indicam que as carcaças bovinas atenderam os padrões de qualidade nacional e internacional em relação à presença de *Salmonella* spp. e, ressaltam a necessidade da existência de Boas Práticas de Fabricação e do sistema de Análise de Risco e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para que o risco de contaminação das carcaça seja reduzido ao máximo.

REFERÊNCIAS

ABIEC. Exportação de carne bovina pode subir ao nível de 2008. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/news_view.asp?id={7CA09E92-9A66-4AB7-9551-742DE3036C01}>. Acesso em: 18 nov. 2010.

AGRON, P. G.; WALKER, R. I.; KINDE, H.; SAWIER, S. J.; HAYES, D. C.; WOLLARD, J.; ANDERSEN, G. I. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 4984-4991, November 2001.

ARSLAN, S.; EYI, A. Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 9, p. 1613-1617, September 2010.

ARTHUR, T. M.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Effects of a minimal hide wash cabinet on the levels and prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on the hides of beef cattle at slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 5, p. 1076 – 1079, May 2007.

ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; NOU, X.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KENT, M. P.; JARONI, D.; PAULING, B.; ALLEN, D. M.; KOOHMARAIE, M. *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, April 2004.

ATLAS, R. M. **Principles of microbiology**. 2. ed. USA: Smith,., 1997. 1298 p.

BACON, R. T.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; HYATT, D. R.; SMITH, G. C. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from beef animal hides and carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 284-290, February 2002.

BACON, R. T.; BELK, K. E.; SOFOS, J. N.; CLAYTON, R. P.; REAGAN, J. O.; SMITH, G. C. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 8, p. 1080 – 1086, August 2000.

BEACH, J. C.; MURANO, E. A.; ACUFF, G. R. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in beef cattle from transport to slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 11, p. 1687-1693, November 2002.

BEATTY, M. E.; LAPORTE, T. N.; PHAN, Q.; VAN DUYN, S. V.; BRADEN, C. A. Multistate Outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Saintpaul infections linked to mango consumption: a recurrent theme. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1337 – 1338, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Circular:** Circular nº 175/CGPE/DIPOA, de 16 de maio de 2005. Aprova os: Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução:** RES nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o: Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 24 nov 2010.

BRASIL. 2010. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2009. Ministério da Saúde, Porto Alegre, RS.

BRICHTA-HARHAY, D. M.; ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; GUERINI, M. N.; KALCHAYANAND, N.; KOOHMARAIE, M. Enumeration of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, cattle carcass, hide and faecal samples using direct plating methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1657-1668, November 2007.

CASTAGNA, S. M. F.; BESSA, M. C.; CARVALHO, D. A.; CARDOSO, M. R. I.; COSTA, M. Resistência a antimicrobianos de amostras de *Salmonella* sp. Isoladas de suínos abatidos no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS**, v. 29, n. 1, p. 44 – 49, 2001.

CDC. 2009. Investigation of an outbreak of *Salmonella* Saintpaul infections linked to raw alfafa sprouts. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/saintpaul/alfafa/>>. Acesso em: 16 nov. 2010.

CDC. 2008. Investigation of outbreak of infections caused by *Salmonella* Saintpaul. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/saintpaul/jalapeno/index.html>>. Acesso em: 16 nov. 2010.

CLSI. 2010. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M02-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

COSTALUNGA, S; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 342-346, Outubro/Dezembro 2002.

DE PAULA, C. M. D.; MARIOT, R. F.; TONDO, E. C. Thermal inactivation of *Salmonella* Enteritidis by boiling and frying egg methods. **Journal of Food Safety**, v. 25, n. 1, p. 43-57, February 2005.

DUFFY, L.; BARLOW, R.; FEGAN, N.; VANDERLINDE, P. Prevalence and serotypes of *Salmonella* associated with goats at two australian abattoirs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 193 – 197, February 2009.

EUROPEAN COMMISSION. Commission regulation (EC) Nº 2073/2005 of 15 november 2005 on microbial criteria for foodstuffs. Official Journal of European Union 338: 12 – 29.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Pathogen reduction: Hazard analysis and critical control point (HACCP) system, final rule. Fed. Regist. 61: 38806-38989.1996.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182 p.

FUZHARA, T. O.; FERNANDES, S.A.; FRANCO, B. D. G. de M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 12, p. 1749-1753, December 2000.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in human foodborne outbreaks tha occurred in the south of Brazil, 1999 – 2000. **Journal of Food Safety**, v. 25, p. 173 – 182, February 2005.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; de OLIVEIRA, F. A.; CANAL, C. W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1229-1233, June 2004.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEIL, F.-X. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White – Kauffmann – Le Minor scheme. **Research in Microbiology**. v. 161, p. 26 – 29, 2010.

ISO. 2002. ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

JAIN, S.; BIDOL, S. A.; AUSTIN, J. L.; BERL, E.; ELSON, L.; LEMAILE-WILLIAMS, M.; DEASY III, M.; MOLL, M. E.; REA, V.; VOJDANI, J. D.; YU, P. A.; HOEKSTRA, R. M.; BRADEN, C. R.; LYNCH, M. F. Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium and Saintpaul infections associated with unpasteurized orange juice – United States, 2005. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1065 – 1071, 2009.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 675 p. 2005.

MADDEN, R. H.; ESPIE, W. E.; MORAN, L.; MCBRIDE, J.; SCATES, P. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in northern Ireland. **Meat Science**, v.58, n. 4, p. 343-346, August 2001.

MEYER, C.; THIEL, S.; ULLRICH, U.; STOLLE, A. *Salmonella* in raw meat and by – products from pork and beef. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 10, p. 1780 – 1784, October 2010.

McEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A. The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 693-700, April 2003.

MIKOLAJCZYK, A.; RADKOWSKI, M. *Salmonella* spp. on chicken carcasses in processing plants in Poland. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 9, p. 1475 – 1479, September 2002.

MOTSOELA, C.; COLLISON, E. K; GASHE, B. A. Prevalence of *Salmonella* in two Botswana abattoir environments. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 12, p. 1869-1872, December 2002.

NAUGLE, A. L.; BARLOW, K. E.; EBLEN, D. R.; TETER, V.; UMHOLTZ, R. U. S. Food Safety and Inspection Service testing for *Salmonella* in selected raw meat and poultry products in the United States, 1998 through 2003: Analysis of Set Results. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 11, p. 2607-2614, November 2006.

NORRUNG, B.; BUNCIC, S. Microbial safety of meat in the European Union. **Meat Science**, v. 78, n. 1, p. 14-24, January 2008.

OLIVEIRA, F. A. ; FRAZZON, A. P. G. ; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 1, p. 170-176, October 2007.

PHILLIPS, D.; SUMMER, J.; ALEXANDER, J. F.; DUTTON, K. M. Microbiological quality of Australian beef. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 692-696, May 2001.

REID, C.-A.; SMALL, A.; AVERY, S. M.; BUNCIC, S. Presence of food-borne pathogens on cattle hides. **Food Control**, v. 13, n. 6, p. 411 – 415, September/October 2002.

RELATÓRIOS ANUAIS de ETA. Secretaria Estadual de Saúde e do Meio Ambiente. Divisão de Vigilância Sanitária:1987-2000. Porto Alegre, 2000.

ROSE, B. E.; HILL, W. E.; UMHOLTZ, R.; RANSOM, G. M.; JAMES, W. O. Testing for *Salmonella* in raw meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States, 1998 through 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 937-947, June 2002.

RUBY, J. R.; INGHAM, S. C. Use of *Enterobacteriaceae* analysis results for predicting absence of *Salmonella* serovars on beef carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 260 – 266, February 2009.

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 – 2740, December 2007.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI, A. Jr.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. 2000. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20. p. 39-42, Janeiro/Março 2000.

SILVEIRA, J. B; TONDO, E. C. Salmonellosis outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, southern Brazil, during 2000 to 2001. In: **International Symposium Salmonella and Salmonellosis**, Sait-Malo,Fr. [Annals...]. Paris: INRA, 2006, p. 521-522.

SIRAGUSA, G. R.; DORSA, W. J.; CUTTER, C. N.; BENNETT, G. L.; KEEN, J. E.; KOOHMARAIE, M. The incidence of *Escherichia coli* on beef carcasses and its association with aerobic mesophilic plate count categories during the slaughter process. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 10, p. 1269 – 1274, October 1998.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e Patologia Suína**. 2. ed. Goiânia: ,1999. p. 383-387.

SOFOS, J. N.; KOCHEVAR, S. L.; REAGAN, J. O; SMITH, G. C. Incidence of *Salmonella* on beef carcasses relating to the U.S Meat and Poultry Inspection Regulations. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 5, p. 467-473, May 1999.

SORENSEN, O; VAN DONKERSGOED, J.; MCFALL, M.; MANNINEN, K.; GENSLER, G.; OLLIS, G. *Salmonella* spp. Shedding by Alberta beef cattle and the detection of *Salmonella* spp. in ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 3, p. 484-491, March 2002.

STEVENS, A.; KABORÁ, Y.; PERRIER-GROS-CLAUDE, J. D.; MILLEMANN, Y.; BRISABOIS, A.; CATTEAU, M.; CAVIN, J. F.; DUFOUR, B. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, n. 2, p. 178-186, July 2006.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n.5, p. 315-322. set./out. 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 920 p.

VARNAM, A H. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. Aylesbury: Wolfe, 1991. p.51-462.

USDA. 2009. Cattle and beef data and statistics . USDA, Washington, DC.

WEGENER, H.C.; BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997. Copenhagen. **Proceedings...** Copenhagen: [s.n.], 1997. p.3-8.

WILCOCK, B. P.; SCHWARTZ, K. J.; Salmonellosis. In LEMAN, A. D. et al. **Diseases of Swine**, 7 ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. p. 570-583.

ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; FEDORKA-CRAY, P. J.; ZHAO, P.; LADELY, S. Occurrence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DTA104A in retail ground beef . **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 403-407, February 2002.