

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO  
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**FELIPE FACCINI DOS SANTOS**

**QUALIDADE BACTERIOLÓGICA DE PÉS  
DE FRANGOS DE CORTE EM DIFERENTES  
ETAPAS DO PROCESSAMENTO  
TECNOLÓGICO**

**NITERÓI**

**2010**

**UNIVERSIDADE  
FEDERAL  
FLUMINENSE**

FELIPE FACCINI DOS SANTOS

QUALIDADE BACTERIOLÓGICA DE PÉS DE FRANGOS DE CORTE EM  
DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

ORIENTADOR: PROFESSORA DRA. VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA - UFF

CO-ORIENTADOR: PROFESSOR DR. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO - UFF

CO-ORIENTADOR: PROFESSOR DRA. MARIA HELENA COSENDEY DE AQUINO - UFF

Niterói  
2010

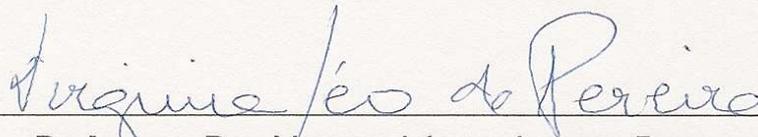
FELIPE FACCINI DOS SANTOS

QUALIDADE BACTERIOLÓGICA DE PÉS DE FRANGOS DE CORTE EM  
DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO

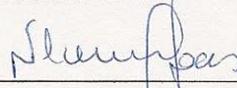
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2010

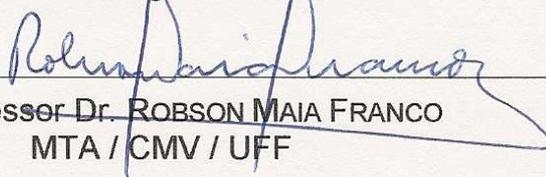
BANCA EXAMINADORA



Professora Dra. VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA  
MSV / CMV / UFF



Professor Dra. NILCE MARIA SOARES  
Instituto Biológico / SAA / SP



Professor Dr. ROBSON MAIA FRANCO  
MTA / CMV / UFF

Niterói  
Fevereiro, 2010

Aos meus pais, José Carlos dos Santos e Jane Catharina Faccini dos Santos, por todo amor, dedicação e apoio às minhas decisões.

À minha orientadora e amiga, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virginia Léo de Almeida Pereira, pelos ensinamentos e confiança depositados em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Co-Orientador, Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pela disponibilidade e apoio no desenvolvimento do projeto e nas análises estatísticas.

À minha Co-Orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Cosendey de Aquino, pelos ensinamentos e auxílio no desenvolvimento dos trabalhos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dayse Lima da Costa Abreu pela ajuda e esclarecimentos durante a realização do experimento.

À Rita de Cássia F. da Silva pelos incentivos e auxílio fundamental na revisão dos trabalhos.

À Raquel Gouvêa pela amizade e grande ajuda na realização do experimento.

Ao Prof. Dr. Robson Maia Franco pela colaboração nas análises microbiológicas.

Ao Márcio Carvalho e à Luciana Sampaio, pela hospitalidade e auxílio durante as coletas.

À minha namorada Mariza Dinah Manes Brandão, por todo apoio, carinho e companheirismo dedicados nos momentos mais difíceis.

À tia Leny, por cuidar de mim como seu próprio filho.

Ao meu irmão, Carlos André Faccini dos Santos, pela amizade e ajuda sempre que precisei.

Aos meus familiares, pela convivência e felicidades proporcionadas.

Aos amigos do Laboratório de Ornitopatologia, Vanessa Simas, Liana Ogino, Davi Almeida, Leandro Machado, Vinicius Teixeira, Fernanda Alves, Lídia Marques, Gabriel Almeida, Samira Mesquita, Leonardo Gazé, Felipe Grillo, Môsar Lemos, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Barreto, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Almeida.

Ao Prof. Dr. Rodolpho de Almeida Torres Filho pela cooperação e amizade durante a redação da dissertação.

Aos Gerentes de Produção Dr. Robson Eduardo Vivas dos Santos e José de Paula Júnior, pela atenção, colaboração e fornecimento das amostras.

## SUMÁRIO

RESUMO, p. 12

ABSTRACT, p. 13

1 INTRODUÇÃO, p. 14

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p. 16

2.1 O SETOR AVÍCOLA BRASILEIRO, p. 16

2.2 O PRODUTO: PÉS E PATAS DE FRANGO, p. 17

2.3 PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO E INSPEÇÃO SANITÁRIA DE PÉS E PATAS DE FRANGO, p. 19

2.4 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL, p. 20

**2.4.1 Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis em Alimentos, p. 23**

**2.4.2 Número Mais Provável de Coliformes Totais e Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes, p. 24**

2.5 *Escherichia coli* O157:H7, p. 25

**2.5.1 Descrição do sorotipo O157:H7, p. 27**

**2.5.2 Patogênese, patologia e fatores de virulência, p. 28**

**2.5.3 Ocorrência em humanos e alimentos, p. 29**

2.6 *Salmonella* spp., p. 31

**2.6.1 Classificação e nomenclatura, p. 31**

**2.6.2 Patogênese, patologia e fatores de virulência, p. 33**

**2.6.3 Ocorrência em humanos, p. 35**

**2.6.4 Ocorrência em aves e produtos derivados, p. 37**

**2.6.5 Eliminação de *Salmonella* spp. pelo calor**, p. 40

**3 MATERIAL E MÉTODOS**, p. 42

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS, p. 42

3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS, p. 43

**3.2.1 Análises quantitativas**, p. 43

3.2.1.1 Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis, p. 43

3.2.1.2 Número Mais Provável de Coliformes Totais e Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes, p. 44

**3.2.2 Análises qualitativas**, p. 44

3.2.2.1 Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7, p. 45

3.2.2.2 Pesquisa de *Salmonella* spp., p. 46

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS, p. 47

**4 RESULTADOS**, p. 48

4.1 ANÁLISES QUANTITATIVAS, p. 48

4.2 ANÁLISES QUALITATIVAS, p. 50

**4.2.1 Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7**, p. 50

**4.2.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.**, p. 50

**5 DISCUSSÃO**, p. 51

**6 CONCLUSÃO**, p. 56

**7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, p. 57

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1 Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis (CPMM) das amostras de pés coletados em quatro etapas do processamento\* ( $\log_{10}$  UFC/g), p. 48
- Tabela 2 Número Mais Provável de Coliformes Totais (CT) nas amostras de pés coletados em quatro etapas do processamento\* ( $\log_{10}$  UFC/g), p. 49
- Tabela 3 Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes (CTT) das amostras de pés coletados em quatro etapas do processamento\* ( $\log_{10}$  UFC/g), p. 49
- Tabela 4 Sorotipos de *Salmonella* identificados em amostras de pés de frangos de corte no início e no final do processamento tecnológico\* em Matadouro de Aves e Coelhos sob Inspeção Sanitária, p. 50
- Tabela 5 Pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de pés coletados em duas etapas do processamento, p. 51
- Figura 1 Médias dos resultados encontrados na CPMM nas etapas do processamento e limites bacteriológicos permitidos pela legislação chinesa para carne de aves, p. 53
- Figura 2 Médias dos resultados encontrados na NMP nas etapas do processamento e limites bacteriológicos permitidos pela legislação chinesa e brasileira para carne de aves, p. 54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEF	Associação Brasileira dos Exportadores de Frango
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
SSP	solução salina peptonada 1% tamponada
SSPr	SSP utilizada na rinsagem dos pés
BHI	“Brain Heart Infusion”
BPLS	Ágar bile peptona lactose sacarose
c	número máximo aceitável de unidades de amostra com contagem entre os limites m e M
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
CPMM	Contagem de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis em Alimentos
CT	Coliformes Totais
CTT	Coliformes Termotolerantes
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
ECDC	“European Center for Disease Prevention and Control”
EFSA	“European Food Safety Authority”
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EUA	Estados Unidos da América

FDA	“Food and Drug Administration”
FIOCRUZ	Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz
FSIS	“Food Safety and Inspection Service”
LIA	“Lisine Iron Agar”
LPS	lipopolissacarídeo
LST	Caldo lauril sulfato triptose
m	limite que, em plano de três classes, separa o lote aceitável do lote de qualidade intermediária aceitável
M	limite que, em plano de três classes, separa o lote aceitável do inaceitável
MACS	Ágar MacConkey base adicionado de sorbitol 1%
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
n	unidade amostral analisada
NMP	Número Mais Provável
OR	“Odds Ratio”
P1	Etapa 1 do processamento tecnológico - após o corte na articulação tíbia-metatarso
P2	Etapa 2 do processamento tecnológico - após escaldagem a 71°C nas três primeiras coletas, a 65°C nas demais, durante 28 segundos e retirada da cutícula
P3	Etapa 3 do processamento tecnológico - saída do “chiller”, após o pré-resfriamento
P4	Etapa 4 do processamento tecnológico - sob congelamento a uma temperatura de aproximadamente -30°C

APC	Ágar padrão para contagem
PREBAF	Programa Nacional de Monitoramento e da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SD	<i>Salmonella</i> Diferencial
SHU	Síndrome Hemolítica-Urêmica
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Ágar Sulfeto Indol Motilidade
SPI	“ <i>Salmonella</i> Patogenicity Islands”
SSTT	Sistema de Secreção tipo Três
Stx	Shiga-like toxin
TSI	“Triple Sugar Iron Agar”
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UNECE	“United Nations Economic Commission for Europe”
USDA	“United States Department of Agriculture”
VBBL	Caldo verde brilhante bile lactose 2%
WHOCC-Salm	“WHO Collaborating Centre for Reference and Research on <i>Salmonella</i> ”

## RESUMO

O Brasil é o terceiro produtor e maior exportador mundial de carne de frango. Os principais destinos da carne de frango produzida no Brasil são o Oriente Médio e Ásia. Para atender aos mercados consumidores com qualidade e preço, a indústria avícola precisa ser competitiva e buscar a diversificação de produtos. O aproveitamento dos pés de frango pode ser uma opção bem lucrativa. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, pelas análises quantitativas (Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios - CPMM), Número Mais Provável de Coliformes Totais - CT e Termotolerantes - CTT) e qualitativas (Pesquisa de *E. coli* O157:H7 e de *Salmonella* spp.), a qualidade bacteriológica de pés de frango como produto para consumo humano em diferentes etapas do processamento tecnológico em indústria sob Inspeção Sanitária Federal. Para as análises quantitativas, foram coletados 80 pés de frangos de corte, de 20 lotes distintos, em quatro etapas do processamento: no início, após o corte na articulação tíbia-metatarso (P1); após escaldagem e retirada da cutícula (P2); após o pré-resfriamento, na saída do “chiller”, (P3); e no final do processamento, após o congelamento (P4). Para as análises qualitativas, foram coletados 15 pés, logo após o corte na articulação tíbia-metatarso (P1) e 15 pés, após o congelamento (P4), também de 20 lotes. De um dos lotes coletados não foi possível a realização das análises. Houve diminuição na contaminação dos pés de frango ao longo do processamento tecnológico, observada através das análises quantitativas de CPMM, CT e CTT. Nenhuma das amostras de *Escherichia coli*, isoladas em P1 ou em P4, foi confirmada como O157:H7. Dos 19 lotes analisados, 13 (68,42%) foram positivos para *Salmonella* spp., a partir das amostras coletadas em P1. Nas amostras de P4, apenas um (5,26%) lote foi positivo para *Salmonella*. A chance de haver *Salmonella* spp. em P1 foi 39 vezes maior que em P4 (OR=39,00; P<0,05; IC= 4,17 a 363,64). O sorotipo *Salmonella* Schwarzengrund foi encontrado em 13 dos 19 lotes de frangos estudados e os sorotipos *Salmonella* Anatum e *Salmonella* Corvallis foram identificados em um lote.

Palavras-chave: patas, microbiologia, corte de frango, descontaminação, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, O157:H7, coliformes, totais, termotolerantes, indicadores.

## ABSTRACT

Brazil is the third largest producer and exporter of chicken meat. The main destinations of chicken meat produced in Brazil are the Middle East and Asia. To meet the consumer markets with quality and price, the poultry industry must be competitive and seek for diversification of its products. The use of chicken feet can be a very lucrative option. This study aimed to evaluate, by the quantitative analysis (Aerobic Mesophilic Standard Count - CPMM), Most Probable Number of Total Coliforms - CT and Thermotolerant Coliforms - CTT) and qualitative (Detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp.), the microbiological quality of chicken feet as a product for human consumption in different steps of technological processes in industry under Federal Inspection. For the quantitative analysis 80 feet of broilers of 20 separate flocks were collected, with four processing steps: at the beginning, after cutting the joint tibia-metatarsus (P1); after scalding and removal of the cuticle (P2); after cooling, the output of the chiller (P3), and at the end of processing, after freezing (P4). For the qualitative analysis, there were collected 15 feet, after cutting the tibia-metatarsus (P1) and 15 feet, after freezing (P4), also from 20 flocks. It was not possible to analyse one of them. There was decrease of the contamination of chicken feet along the technological processes, observed through quantitative analysis of CPMM, CT and CTT. None of *E. coli* isolated from P1 or P4, was confirmed as O157: H7. From samples collected in P1, 19 of 13 flocks (68.42%) were positive for *Salmonella* spp. From samples at P4, only one (5.26%) was positive, which was also in P1. The chance to be *Salmonella* spp. in P1 was 39 times higher than in P4 (OR = 39.00, P <0.05, CI = 4.17 to 363.64). In one of the 19 flocks of chickens studied, the serotypes *Salmonella* Corvallis and *Salmonella* Anatum were identified, in all other was found -the serotype Schwarzengrund.

Key words: feet, microbiology, cut chicken, decontamination, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157: H7, coliforms, total coliforms, indicators.

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola brasileira vem batendo sucessivos recordes de produção, exportação e consumo interno, sendo o Brasil, hoje, o maior exportador e terceiro produtor mundial de carne de frango (ABEF, 2010). Para assegurar estes mercados, a indústria deve ser cada vez mais competitiva e diversificada em seus produtos, procurando atender os mercados consumidores com qualidade e preço. Neste contexto, o aproveitamento dos pés de forma mais lucrativa é fundamental, porque representam uma porção importante no peso final do frango e possuem baixo valor comercial em nosso País, sendo considerados principalmente como subproduto e destinados à fabricação de rações animais.

Os mercados orientais são os que se destacam atualmente em relação à comercialização de pés de frango, com maior valor agregado, destinado ao consumo humano. Estes mercados estão em franca expansão, com consumidores de poder aquisitivo cada vez maior e aumento insuficiente da produção para suprir o mercado interno. Com a intensificação da comercialização internacional, aumentaram as preocupações com a qualidade e segurança destes produtos. Em 2005 foram estabelecidos na China, principal importador mundial de pés de frangos, novos padrões para aceitação de carnes de frango, tendo sido considerados muito rigorosos em comparação à legislação de outros países (WHO, 2007).

Muitos fatores influenciam na qualidade microbiológica dos alimentos, desde sua produção até o consumo. O controle sobre todas as etapas pelas quais o alimento passa, garante sua qualidade e diminui os riscos e, para isso, uma série de leis e padrões internacionais foram implementados.

O monitoramento das doenças transmitidas por alimentos é dificultado por diversos fatores, sendo a subnotificação, o principal. Entre os causadores de doenças transmitidas por alimentos estão patógenos como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7. Por vezes as complicações decorrentes da infecção por estas bactérias são muito sérias, podendo levar à morte. Somente cinco patógenos são responsáveis por 90% das mortes associadas ao consumo de alimentos contaminados: *Salmonella* (31%), *Listeria* (28%), *Toxoplasma* (21%), vírus Norwalk-like (7%), *Campylobacter* (5%) e *E. coli* O157:H7 (3%) (MEAD, 1999).

No Brasil foi regulamentado um limite máximo de tolerância de coliformes termotolerantes em carnes de aves, sendo estes organismos, indicadores de qualidade e higiene durante a produção (BRASIL, 2001a). Também foi aprovada uma Instrução Normativa que instituiu o Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus (BRASIL, 2003a). Este programa tem como objetivo a redução na prevalência de carcaças contaminadas através do monitoramento ativo pela Serviço de Inspeção Federal.

Como a produção de pés é voltada principalmente para o mercado externo, e no Brasil ainda não há uma legislação específica que determine o padrão de qualidade dos pés, as indústrias estão inspecionando e classificando esse produto de acordo com as exigências do mercado consumidor.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar, pelas análises quantitativas (Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios, Número Mais Provável de Coliformes Totais e Termotolerantes) e qualitativas (Pesquisa de *E. coli* O157:H7 e de *Salmonella* spp.), a qualidade microbiológica de pés de frango como produto para consumo humano em diferentes etapas do processamento tecnológico em indústria sob Inspeção Sanitária Federal.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O SETOR AVÍCOLA BRASILEIRO**

Desde a década de 1970, o Brasil vem se destacando no mercado mundial de países produtores de carne de frango por seu crescimento constante ao longo dos anos, sendo atualmente o terceiro maior produtor mundial (TALAMINI et al., 2005) e tendo conquistado em 2004 a posição de maior exportador mundial de carne de frango (ABEF, 2008). Desde então, a indústria avícola vem batendo sucessivos recordes de produção, exportação e consumo interno. Porém, com os recentes efeitos da crise financeira internacional, houve uma ligeira queda em 2009. A produção nacional de frango em 2008 foi de 10,9 milhões de toneladas, crescimento de 4,5% em relação a 2007. Em 2009 a produção foi praticamente a mesma de 2008, havendo uma redução de 0,03% (UBA, 2009; ABEF, 2009).

As exportações em 2008 somaram 3,6 milhões de toneladas, registrando crescimento de 10,9% em relação ao ano anterior. Em 2009 o volume exportado foi similar ao realizado em 2008, havendo redução de 0,3%. A receita cambial, que somou US\$6,9 bilhões em 2008, sofreu uma queda de 16,33%, com US\$5,8 bilhões em 2009. Deste total, os embarques de cortes de frango em 2009 foram da ordem de 1,9 milhões de toneladas, representando 51,92% do total de frango exportado. Isso significou queda de 3,3% em relação ao ano anterior e de 20% na receita cambial, que foi de US\$2,9 bilhões (ABEF, 2010).

Os principais destinos da carne de frango produzida no Brasil são o Oriente Médio e Ásia. Em 2009, foram embarcadas para o Oriente Médio, 1,37 milhões de toneladas, 37,63% do total exportado e um incremento de 22,87% em relação ao ano anterior, porém com aumento de apenas 0,5% na receita que foi de US\$1,9 bilhão. Para a Ásia foram exportadas 946 mil toneladas, 26,05% do total exportado,

representando discreto aumento de 1,20% no volume, com redução de 26% na receita cambial, totalizando US\$1,5 bilhão (TURRA, 2010).

## 2.2 O PRODUTO: PÉS E PATAS DE FRANGO

Na Resolução nº1, de 09 de janeiro de 2003 (BRASIL, 2003c), que aprova a uniformização da nomenclatura de produtos cárneos não formulados em uso para aves entre outras espécies animais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), há descrição de vários produtos obtidos de aves e seus cortes, incluindo os pés como um tipo de corte.

Em 2007, a Comissão Econômica das Nações Unidas para a Europa (UNECE) fez a divisão e padronização comercial dos produtos, pés e patas, elaborando um documento com colaborações de vários países, incluindo o Brasil.

Os pés são processados, após removidos da carcaça, com o corte da perna na articulação entre o metatarso e a tíbia. As unhas e a fina cutícula amarela que cobre os pés são removidas. Os pés processados consistem, então, no metatarso e quatro dedos com a carne e pele associados. Para produzir a pata, o corte é feito no metatarso aproximadamente na altura do esporão. A diferença entre pé e pata consiste na altura do corte no momento da separação da carcaça (UNECE, 2007).

Para a indústria, o aproveitamento dos pés de forma mais lucrativa é fundamental, uma vez que representam uma porção importante do peso final do frango. Loddi et al. (2000) encontraram valores entre 5,79 a 6,15% do peso dos pés em relação à carcaça de aves linhagem Ross. Santos et al. (2005) compararam os valores de rendimento dos pés de frango entre uma linhagem industrial e duas coloniais, obtendo 3,61 para machos e 3,53% para fêmeas da linhagem Cobb (G500), 4,21 e 3,41% para linhagem Paraíso Pedrês e 4,00 e 3,38% para linhagem ISA Label (Isa JA 57).

Na constituição dos pés do frango, elevada quantidade de proteínas e lipídeos é encontrada, sendo altos também os teores de colágeno dentre as proteínas. A composição centesimal dos pés de frango foi estudada objetivando o aproveitamento secundário através do uso do colágeno (ALVES; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 2002; LIU et al., 2001). Tecidos ricos em colágeno são importantes para estabilizar emulsões e fornecer propriedades texturais em hambúrgueres, linguiças, salsichas e mortadelas. A molécula de colágeno é 60% hidrofóbica e durante o

processamento de produtos cárneos em temperaturas de 60 °C a 65°C, as fibras colagenosas começam a encolher, desnaturar e gelatinizam, tornando-se capazes de encapsular a gordura (ALVES; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 2002).

As propriedades terapêuticas para o colágeno hidrolisado extraído de pés de frango são citadas por alguns pesquisadores. Iway et al. (2005) observaram que peptídeos deste colágeno foram absorvidos diretamente para a corrente sanguínea. A partir de então, estudos *in vitro* puderam ser delineados para examinar potenciais efeitos biológicos pela ingestão de produtos à base de gelatina. Após a administração do colágeno a ratos, Saiga et al. (2008) identificaram efeito significativo na redução da pressão sanguínea em ratos hipertensos espontaneamente e Watanabe-Kamiyama et al. (2010) observaram aumento da matriz orgânica dos ossos, sugerindo possíveis efeitos benéficos sobre a osteoporose.

Na maioria dos países, inclusive no Brasil, os pés de frango são considerados um subproduto, sem valor comercial para o mercado interno, tendo como destino final a graxaria. Apenas uma pequena parte é comercializada no mercado interno para a produção de frango inteiro, quando pés e cabeças são colocados em saco plástico individual, juntamente com os miúdos, no interior ou não das carcaças (BRASIL, 1998). Para os orientais, estes cortes possuem grande importância comercial e são considerados como verdadeiras iguarias da culinária asiática. Podem ser consumidos como ingredientes em sopas ou marinados (RODRIGUES, 2008).

O Brasil exporta pés de frango para o Oriente há pelo menos 20 anos, porém, com a abertura do mercado chinês nos últimos anos, este processo se intensificou (RODRIGUES, 2008). A importação deste produto pela China correspondeu em 2008 a maior parte das importações de produtos avícolas, representando 61,76% do total importado pela China. Em relação ao Brasil, o comércio de pés é ainda mais importante, representando 82,57% das exportações de produtos de frango ao País (ZHANG, 2009).

Segundo Rodrigues (2008), comerciantes brasileiros venderam pés e patas de frango em 2008 aos países orientais a um valor que variou entre US\$1.000 e US\$1.600 a tonelada. No mesmo ano, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) declarou que China e Hong Kong foram responsáveis por 97,3% das importações de pés provenientes do País, vendidos a um preço

médio de US\$666 a tonelada (USDA, 2009). Neste período o frango inteiro foi comercializado a um valor médio por tonelada de US\$1.467 em Hong Kong e a US\$1.540 na China (APA, 2010).

### 2.3 PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO E INSPEÇÃO SANITÁRIA DE PÉS E PATAS DE FRANGO

O processamento tecnológico dos pés e patas de frango tem seu início no corte da perna e sua separação da carcaça, que pode ocorrer ainda na área suja, antes do primeiro transpasse, ou já na área limpa, após a inspeção sanitária. Quando o corte é feito ainda na área suja, deve haver um “Ponto de Inspeção” antes do corte para a retirada de frangos com características que determinam a condenação total da carcaça. Deve haver equipamento adequado e/ou área destinada à escaldagem de pés e retirada da cutícula, quando se destinarem para fins comestíveis (BRASIL, 1998). No Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal de 1952, constam duas faixas de temperatura utilizadas na escaldagem, 82°C a 90°C e entre 53°C e 55°C, embora outras possam ser utilizadas, desde que aprovadas previamente pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) (BRASIL, 1952). Após este processo, os pés devem ser imediatamente pré-resfriados em resfriadores contínuos (“chiller”) por imersão exclusivos para este fim, obedecendo ao princípio de renovação de água e contracorrente à temperatura máxima de 4°C (BRASIL, 1998).

É grande a ocorrência do chamado calo de pé. Este tipo de lesão se enquadra no Anexo IX – Destinos e Critério de Julgamento em Aves com Dermatoses da Portaria nº 210 do MAPA (BRASIL, 1998). “As carcaças de aves que possuem evidência de lesão na pele, e/ou carne das mesmas, deverá ser rejeitada a parte atingida, ou quando a condição geral da ave foi comprometida pelo tamanho, posição ou natureza da lesão, as carcaças e vísceras serão condenadas”. Como a produção de pés é voltada principalmente para o mercado externo, e no Brasil ainda não há uma legislação específica que determine o padrão de qualidade dos pés, as indústrias estão inspecionando e classificando esse produto de acordo com as exigências do mercado consumidor (TEIXEIRA, 2008). Devido ao baixo custo de mão-de-obra em relação a outros países, principalmente os Estados Unidos da América (EUA), que é o principal competidor internacional pelo mercado

de pés, as indústrias brasileiras podem selecionar melhor o produto e acondicionar em embalagens menores, garantindo melhor qualidade e apresentação do produto no exterior (BEAN et al., 2007).

#### 2.4 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

Em um processo tão complexo quanto a produção e consumo de alimentos, muitos fatores afetam tanto a probabilidade quanto a severidade da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (LAMMEERDING et al., 2001). O número de microrganismos em um alimento é variável em razão da contaminação inicial, aumento ou redução durante processamento, recontaminação de produtos processados, armazenamento, venda e manipulação. A microbiota está mudando constantemente (BANWART, 1981a).

Avaliações de riscos associados a alimentos em geral ou atribuídos à alimentos específicos, são predominantemente descrições qualitativas de perigos, rotas de exposição, práticas de manipulação e consequências de exposição. Quantificar qualquer destes elementos é desafiador, uma vez que muitos fatores influenciam no risco de doenças transmitidas por alimentos, por isso, interpretações de dados sobre prevalência, números, comportamento de microrganismos e estatísticas em saúde coletiva se tornam complicadas. Consequentemente, políticas, regulamentos e outros tipos de decisões, em relação à segurança dos alimentos foram largamente baseadas em aspectos subjetivos e especulativos. Com os avanços no conhecimento, nas técnicas analíticas e nos dados de saúde coletiva, aliados à crescente preocupação de consumidores, comércio internacional e estudos econômicos e sociais do impacto das doenças transmitidas por alimentos, os métodos quantitativos na avaliação de riscos tornaram-se um reforço para a tomada de decisões no contexto da segurança dos alimentos (LAMMERDING et al., 2001). Apoiados nestes novos conceitos, uma série de regulamentações foi implementada com objetivo de controlar a produção dos alimentos e diminuir riscos aos consumidores (BRASIL, 2001a; BRASIL, 2001b; BUGANG, 2006).

Na RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, emitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), há determinação que o padrão microbiológico da carne de aves deve ser analisado segundo um plano de três classes. A unidade amostral analisada (n) pode ser classificada como aceitável, de qualidade

intermediária aceitável ou inaceitável, em função de limites intermediário (m) e máximo (M) de contaminação, além de um número aceitável de unidades de amostra, designado por c, com contagem entre os limites m e M. As demais unidades devem apresentar valores menores ou iguais a m. Se qualquer das unidades apresentar valores superiores ao M, o produto é considerado inaceitável. O único padrão definido pela legislação para carne de aves *in natura* é para coliformes termotolerantes, no qual o limite para amostra indicativa, quando n é menor que cinco amostras, é de  $1 \times 10^4$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g ou Número mais Provável (NMP)/g. Para amostragem representativa, quando n é igual a cinco amostras, até três amostras podem ter resultados entre  $5 \times 10^3$  UFC/g ou NMP/g e  $10^4$  UFC/g ou NMP/g para serem consideradas de qualidade intermediária e com menos de três amostras dentro desta faixa o produto é considerado de qualidade aceitável (BRASIL, 2001a).

A RDC nº 13, de 2 de janeiro de 2001, que aprova o Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carne de Aves e Seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados, traz aos produtores a obrigatoriedade de incluir essas instruções na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados. Estas instruções funcionam medidas que auxiliem o consumidor no controle do risco de infecção por *Salmonella* spp. associada ao consumo destes alimentos (BRASIL, 2001b).

Em 2003 foi instituído pelo MAPA, o Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. Este programa implementa a análise sistemática e contínua de carcaças *in natura*, para pesquisa de *Salmonella* spp. em todos os estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal. Para isso, foi estabelecido um plano de duas classes, em que a cada ciclo de 51 amostras são aceitas até 12 amostras positivas. Quando o ciclo não é violado, o estabelecimento recebe certificação do MAPA referente à ausência de *Salmonella* spp. no produto final. Porém, dependendo do número de vezes em que foi violado, sanções são impostas ao estabelecimento, desde notificação oficial para revisão dos programas de qualidade e controle até liberação dos lotes condicionada à testes negativos para *Salmonella* spp. (BRASIL, 2003a).

A partir de 2005 os padrões tecnológicos e sanitários dos pés de frango para a produção e comercialização em Hong-Kong e na China Continental foram

unificados. Novos padrões microbiológicos foram definidos para aplicação em produtos resfriados e congelados. Para produtos resfriados, é aceita uma contagem total de bactérias aeróbias de  $1,0 \times 10^6$  UFC/g e de coliformes de  $1,0 \times 10^4$  NMP/100g e para produtos congelados, é aceita uma contagem total de bactérias aeróbias de  $5,0 \times 10^5$  UFC/g e de coliformes de  $5,0 \times 10^3$  NMP/100g. Tanto para produtos resfriados como congelados foi estabelecido como padrão a ausência dos patógenos *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 em cinco amostras de 25 gramas (BUGANG, 2006).

Três métodos gerais que são empregados para estimar a presença de microrganismos viáveis em amostras são: o método de contagem em placa, método de NMP e método de membrana filtrante. O princípio básico destes métodos é que após incubação, a população de microrganismos originalmente presente pode ser estimada contando-se as colônias formadas ou número de tubos mostrando evidências de crescimento pela diluição utilizada. Variando o meio de crescimento ou condições de incubação, diferentes microrganismos podem ser enumerados utilizando qualquer dos métodos. O melhor meio e condições para determinação do número de colônias pode variar entre um alimento e outro e, uma vez determinado, pode ser muito útil na análise rotineira de alimentos. A competência e precisão do analista é muito importante, uma vez que pequenas variações nos procedimentos podem alterar os resultados obtidos na contagem de colônias (SWANSON et al., 2001).

Kotula e Pandya (1995) realizaram um trabalho para avaliar a carga bacteriana em penas, pele e pés de frangos abatidos, antes da escaldagem. Obtiveram as menores contagens para a contaminação nos pés com valor médio de  $6,2 \log_{10}$  UFC/g. Também estudaram a prevalência de *Salmonella* spp. em pés de frangos antes da escaldagem, estando contaminados 55% dos lotes analisados.

Bilgili et al. (2003; 2010) apresentaram no “International Poultry Scientific Forum” e publicaram em forma de resumo um estudo para verificar as diferenças nos níveis de contaminação de patas após o pré-resfriamento, entre indústrias com e sem fiscalização do “Food Safety and Inspection Service” (FSIS). Como resultados foram obtidas média de  $3,14 \log_{10}$  para Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios (CPMM),  $-1 \log_{10}$  para *E. coli* e prevalência de 2,78% de *Salmonella* spp., tendo sido destacado pelos autores, os baixos índices de

contaminação, que se deram provavelmente pelo processo de produção das patas (BILGILI et al., 2003, BILGILI, 2010).

Em relação aos pés de frango como alimento de origem animal, existe a necessidade de implementação de legislação específica, estabelecendo padrões de qualidade considerando as diferenças no processamento tecnológico em comparação a outros cortes.

#### **2.4.1 Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis em Alimentos**

A Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis em Alimentos (CPMM) não é uma medida de toda a população bacteriana, mas uma análise genérica para quantificar microrganismos que crescem em aerobiose ou microaerobiose em temperaturas para mesófilos, geralmente utilizadas entre 25°C a 37°C (HARRIGAN, 1998; MORTON, 2001).

O método mais utilizado e que possui maior precisão na realização da CPMM é o de “pour plate”. Duas importantes suposições estão relacionadas ao método, a primeira, de que os microrganismos em suspensão estão dissociados em células únicas e cada uma formará uma colônia; e a segunda, de que todas as células semeadas no meio de cultura irão crescer e formar uma colônia, porém, nenhuma é precisa. Nem todas as colônias se formarão a partir de células únicas, pois bactérias geralmente crescem em aglomerados e cadeias e os movimentos realizados na homogeneização não são suficientes para desfazer todas as ligações. O ambiente (meio, temperatura, oxigênio) em que os microrganismos são colocados, assim como os tratamentos aos quais as bactérias são submetidas (aquecimento subletal, congelamento, irradiação) ou mesmo a presença de diferentes tipos de microrganismos terão influência na capacidade de multiplicação. Com todos estes erros, a contagem em placas pode representar algo entre 10% e 90% do número real presente em uma amostra (BANWART, 1981a).

CPMM é um mal indicador de segurança na maioria dos casos, uma vez que não está diretamente correlacionada com a presença de patógenos ou toxinas. Baixas contagens de microrganismos não significam produtos livres de patógenos, assim como altas contagens não significam sua presença. No entanto, dependendo da situação, CPMM pode ser importante na avaliação da qualidade do alimento.

Nestes casos, altas contagens podem significar problemas de higiene, no controle do processamento ou com ingredientes (BANWART, 1981; MORTON, 2001).

#### **2.4.2 Número Mais Provável de Coliformes Totais e Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes**

Schardinger em 1892 e Smith em 1895, em trabalhos independentes, introduziram o uso de *E. coli* como microrganismo indicador da potencial presença de patógenos entéricos em água, por exemplo *Salmonella Typhi*. A premissa era que *E. coli* em água indicava contaminação fecal porque *E. coli* e patógenos entéricos eram encontrados nas fezes de animais de sangue quente. Posteriormente, *E. coli* e coliformes foram utilizados como indicadores de leite pasteurizado e produtos lácteos e depois para outros alimentos. Sem muitos estudos, foram utilizados em um largo espectro de alimentos com diferentes ecologias microbianas. Já em 1924, pesquisadores alertaram que alguns métodos analíticos que funcionavam bem para analisar água, não se prestavam para análises de leite. Estes paradigmas históricos originados no campo do sanitarismo de água continuaram a causar confusão na área de alimentos (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

A presunção de que a presença ou altos números de *E. coli*, coliformes, coliformes termotolerantes ou *Enterobacteriaceae* em alimentos significa que ocorreu contaminação fecal é equivocada por uma série de razões: estas bactérias não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente; é sabido que existem reservatórios destes microrganismos no ambiente; são comuns em ambientes de manipulação de alimentos e podem fazer parte da microbiota residente, especialmente quando não há sanitização adequada e o crescimento de alguns coliformes, coliformes termotolerantes e *Enterobacteriaceae* pode acontecer sob refrigeração. Nos anos 70, uma primeira tentativa de se diferenciar *E. coli*, coliformes e *Enterobacteriaceae* foi realizada entre utilizá-los como indicadores da potencial presença de patógenos e como indicadores de qualidade geral de alimentos (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

A maior aplicação de testes para *E. coli*, coliformes e *Enterobacteriaceae* é a análise da qualidade geral de um alimento e condições higiênicas presentes no momento do processamento. A enumeração destes microrganismos em produtos

tratados termicamente, por exemplo, pode ser utilizada para verificar se o processamento foi suficiente para inativar as bactérias vegetativas presentes no alimento (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Coliformes Totais (CT) são bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, Gram negativas, bacilos não formadoras de esporo e que fermentam lactose, formando ácido e gás, quando incubadas a 35°C durante 48 horas. Podem ser classificadas como coliformes totais, 20 ou mais espécies. Coliformes Termotolerantes (CTT) são definidos como os coliformes que fermentam lactose produzindo ácido e gás quando incubadas entre 44,5°C e 45,5°C em 48 horas, geralmente em Caldo EC. Cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. (incluindo *agglomerans*, *aerogenes* e *cloacae*) e *Citrobacter freundii* podem ser recuperadas no teste de coliformes termotolerantes dependendo do alimento e temperatura de incubação (KORNACK; JOHNSON, 2001; LANDGRAF, 2008).

As análises de CT e CTT são realizadas pela técnica de NMP. Esta técnica possui algumas vantagens como a recuperação de células danificadas devido ao enriquecimento do meio, ausências de danos à célula causados pelo calor que meios “sólidos” derretidos (como acontece na técnica de “pour plate”), não há confusão entre partículas e colônias durante contagem feita em meios sólidos e ajuste da sensibilidade do teste alterando a quantidade e/ou diluição testada (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

## 2.5 *Escherichia coli* O157:H7

A *E. coli*, identificada como parte da microbiota da maioria dos animais, foi considerada como um microrganismo não patogênico durante muito tempo. Posteriormente foi estimado que 10 a 20% das cepas sejam potencialmente patogênicas aos animais. Estudos relacionados a patogenicidade de *E. coli* mostraram que as amostras patogênicas possuem mecanismos de virulência específicos, e por isso, as diferentes amostras foram classificadas em patotipos: *E. coli* enteroinvasora, *E. coli* enterotoxigênica, *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* uropatogênica e *E. coli* que adere difusamente (FERREIRA ; KNOBL, 2009; NATARO; KAPER, 1998).

O gênero *Escherichia* pertence à família Enterobacteriaceae e é dividido em cinco espécies: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*, porém a

espécie *E. coli* é considerada a espécie de importância do gênero. *Escherichia coli* teve sua primeira descrição em 1885 por Theodor von Escherich, denominando-a de *Bacterium coli commune*. (CAMPOS, 1999; FERREIRA; KNOBL, 2009).

Os organismos da espécie *E. coli* são Gram negativos, possuem a forma de bastonetes curtos, cujo tamanho varia de 1,1 a 1,5  $\mu\text{m}$  x 2 a 6  $\mu\text{m}$ , não formam esporos, são anaeróbios facultativos. Algumas possuem cápsula e geralmente são móveis pela presença de flagelos peritríquios, existindo também cepas imóveis (FERREIRA; KNOBL, 2009).

*E. coli* apresenta resultado positivo para os testes bioquímicos de vermelho de metila, indol, lisina e motilidade e resultado negativo para os testes de utilização do citrato, hidrólise de ureia, produção de gás sulfídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) e oxidase (FERREIRA; KNOBL, 2009). Fermenta a glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramnose e arabinose com produção de ácido e gás. A lactose é fermentada por 90% das cepas, o restante, incluindo muitas cepas patogênicas são tipicamente lactose negativas (NATARO; KAPER, 1998; FERREIRA; KNOBL, 2009). Enquanto 90% das cepas isoladas de *E. coli* fermentam sorbitol, *E. coli* O157:H7 não o faz, característica utilizada na técnica de isolamento (DOYLE, 1991), embora existam algumas cepas deste sorotipo que são sorbitol positivas (ORDOÑEZ; TRABULSI, 2005).

*Escherichia coli* crescem a temperaturas que podem variar entre 18 e 44°C, sendo ideal a temperatura de 37°C (FERREIRA; KNOBL, 2009). Outra diferença importante do sorotipo O157: H7 para os demais é a inabilidade de crescer à temperaturas de 44 a 44,5°C (DOYLE, 1991). Pesquisadores demonstraram que a temperatura para o crescimento e produção de gás de *E. coli* O157:H7 no caldo EC em 48 horas varia entre 19,3°C a 41,0°C, ou seja, pelos procedimentos tradicionais, o isolamento deste sorotipo fica prejudicado (RAGHUBEER; MATCHES, 1990). Diversos trabalhos foram realizados para estudar a tolerância da bactéria à temperaturas elevadas. Utilizando carne de frango moída inoculada com *E. coli* O157:H7 com 3% e 11% de gordura, Ahmed et al. (1995) encontraram valores D para 60°C de 0,38 e 0,55 minutos, respectivamente. Ahmed e Conner (1995) encontraram valores D significativamente diferentes para três isolados de *E. coli* O157:H7 a 60°C, 1,38, 1,78 e 2,66 minutos. Kotrola et al. (1997) determinaram os valores D para carne de peru e alguns produtos formulados com diferentes níveis de gorduras e aditivos, encontraram para a temperatura de 60°C valores entre 0,7 e 4,4

minuto. Também estudaram períodos de tempo necessários para redução de 5 log<sub>10</sub>, para 60°C obtiveram períodos entre 8,3 e 18 minutos, enquanto para 71,1°C , entre 0,04 e 0,2 minuto. Juneja e Marmer (1999) utilizaram um “pool” de quatro isolados de *E. coli* O157:H7 inoculados em carne de peru e obtiveram valor D para 60°C entre 1,37 e 2,10 minutos e para 65°C de 0,23 a 0,29 minutos.

### 2.5.1 Descrição do sorotipo O157:H7

O reconhecimento da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) se deu através de duas observações epidemiológicas que foram determinantes para isso. A primeira foi reportada por Riley et al. (1983) que investigou surtos de uma doença gastrointestinal distinta caracterizada por fortes dores abdominais, diarreia aquosa seguida de diarreia com sangue vivo e pouca ou nenhuma febre. Esta doença foi denominada colite hemorrágica e foi associada à ingestão de hambúrgueres mal cozidos. Culturas feitas a partir das fezes dos pacientes demonstraram a presença de um sorotipo de *E. coli* raramente isolado anteriormente, O157:H7. A segunda observação foi realizada por Karmali et al. (1983) quando relacionaram casos esporádicos de Síndrome Hemolítica-Urêmica (SHU) com citotoxinas e *E. coli* produtoras destas citotoxinas nas fezes destes pacientes. Nataro e Kaper (1998) definem SHU pela tríade de falha renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática, já era conhecida por ser tipicamente precedida por uma diarreia sanguinolenta indistinguível da colite hemorrágica.

Posteriormente pesquisadores demonstraram que a toxina era idêntica àquela produzida por *Shigella dysenteriae* 1, toxina Shiga (Stx), considerada como fator de virulência em comum responsável pelos danos nos tecidos intestinal e renal. No início dos anos 80, foram identificados mais de 100 sorotipos de *E. coli* capazes de codificar a toxina, porém somente uma parte era patogênico (NATARO ; KAPER, 1998). O sorotipo de maior importância foi o primeiro a ser identificado, O157:H7. Os outros sorotipos mais frequentemente isolados de humanos pertencentes a este patotipo são, segundo Nataro e Kaper (1998), O26:H11, O103:H2, O111:NM e O113:H21, e segundo Ordoñez e Trabulsi (2005), O26:H11, O103:H2, O111ac:H8, O118:H16 e O145:H28.

O termo *E. coli* enterohemorrágica foi originalmente estabelecido para denotar cepas que causam colite hemorrágica e SHU, produzem Stx, causam lesão do tipo

A/E (aderir/apagar) e que possuem um plasmídeo de 60-Mda (que codifica determinados fatores de virulência como hemolisina) (NATARO; KAPER, 1998; ORDOÑEZ; TRABULSI, 2005).

### 2.5.2 Patogênese, patologia e fatores de virulência

A toxina Shiga pode ser considerada o principal fator de virulência de EHEC, também sendo conhecida como verotoxina ou “Shiga-like toxin”. O nome verotoxina deriva da observação de sua toxicidade frente a células Vero de rins de macacos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Existem dois tipos de Stx que são imunologicamente distintas, Stx1 e Stx2. Enquanto Stx1 é idêntica à toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* 1 e altamente conservada, Stx2 possui variações em sua sequência proteica e estas variantes são designadas de Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2e, etc. As toxinas são formadas por duas subunidades, A e B. A subunidade A remove um resíduo de adenina da porção 28S do rRNA, inibindo a síntese de proteínas, resultando na morte das células do endotélio renal, epitélio intestinal, células Vero ou HeLa ou qualquer outra que possua os receptores Gb<sub>3</sub>. A subunidade B é responsável pela ligação da toxina ao receptor Gb<sub>3</sub> localizado em células eucarióticas, para que a toxina seja internalizada. (FRANCO; LANDGRAF, 2008; NATARO; KAPER, 1998).

Produção de uma enterohemolisina é outro fator de virulência, toxina pertencente à família RTX e que também é produzida por *Pasteurella haemolytica* e outros patógenos humanos. Acredita-se que a lise de eritrócitos *in vivo* liberariam heme e hemoglobina, que favoreceriam o crescimento de *E. coli* O157:H7 pois serviria como fonte de ferro. A bactéria possui um sistema de transporte de ferro especializado para fazer esta utilização através de proteínas de membrana que são sintetizadas quando há falta de ferro no meio. O gene que codifica esta proteína é homólogo ao presente em *Shigella dysenteriae*, porém não está presente em nenhuma outra espécie de *Shigella* ou outro sorotipo de *E. coli* (NATARO; KAPER, 1998).

A única proteína identificada na *E. coli* O157:H7 como fator de aderência, que atua na colonização intestinal é a OMP intimina e confere especificidade da bactéria ao intestino grosso. Esta proteína promove uma íntima ligação da bactéria aos enterócitos, resultando em extensa lesão no intestino do tipo A/E (NATARO;

KAPER, 1998). Estas lesões são caudas por proteínas efetoras e um sistema de secreção do tipo três, codificados por genes na ilha de patogenicidade *LEE* (JANDU et al. 2009).

A patogênese das infecções por EHEC pode ser dividida nas etapas de sobrevivência ao ambiente ácido do estômago, adesão à mucosa e colonização do intestino grosso, produção de Stx e sua absorção pelo hospedeiro causando lesão vascular. Na passagem pelo estômago é ativado um sistema de regulação que as permite sobreviver em ambiente ácido e, devido a isso, é relativamente pequeno o número de bactérias para que haja infecção, entre 10 e 200. A adesão ao epitélio intestinal é mediado pela intimina que se liga à proteína Tir de superfície do enterócito, resultando na lesão A/E. Durante a multiplicação bacteriana, há produção de Stx, que ganha circulação e vai atuar sobre os enterócitos e células endoteliais distantes. Estes danos resultam nas principais manifestações clínicas da infecção por EHEC que são colite hemorrágica e SHU. A doença é auto-limitante durando em média 8 dias (ORDOÑEZ; TRABULSI, 2005).

O período de incubação da doença é de geralmente três a quatro dias, tendo havido surtos descritos com um a dois dias e cinco a oito dias. O primeiro sinal é diarreia não sanguinolenta, porém pode ainda ser precedida por dores abdominais e febres por curtos períodos em alguns pacientes. Vômitos acontecem com metade dos pacientes nesta ou nas fases seguintes da doença. Dentro de um a dois dias a diarreia passa a ter presença de sangue e o paciente sente dores abdominais aumentadas, durando quatro a 10 dias este estágio. Em alguns casos mais severos, os dejetos são descritos como “somente sangue e nenhuma fezes”. A maioria dos pacientes se recupera sem sequelas aparentes, porém em aproximadamente 10% dos pacientes menores de 10 anos, a doença evolui para SHU (DDTHA, 2010a; FDA, 2010b).

### **2.5.3 Ocorrência em humanos e alimentos**

Doyle e Schoeni (1987) estudaram a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em carnes bovina, suína, ovina e de frango resfriadas e vendidas no comércio. A metodologia de isolamento utilizada foi capaz de detectar a bactéria em concentrações de até 1,5 célula por grama de amostra quando esta estava contaminada com uma contagem  $10^5$  células mesófilas, porém o método se mostrou

complexo e oneroso. Em todos os tipos de carne estudados foi observada a presença da bactéria, sendo 3,7% (6/164) nas amostras de carne moída bovina, 1,5% (4/264) em carne suína, 1,5% (4/263) em carne de frango e 2,0% (4/205) em carne ovina. No mesmo trabalho a bactéria foi associada à dois surtos de colite hemorrágica e SHU devido ao consumo de leite não pasteurizado e nuggets de frango. Até então, apenas bovinos eram tidos como reservatórios da bactéria e o único caso de infecção alimentar estudado foi quando Riley et al. (1983) descreveu a bactéria.

Segundo dados divulgados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo, entre os anos de 1998 a 2007, foram confirmados nove casos de SHU e a incidência média no Estado foi de 0,024 casos por 100.000 habitantes, havendo uma taxa de letalidade de 39%. Estes dados são referentes a causas relacionadas ou não aos alimentos (DDTHA, 2010b).

Pelas informações da “European Food Safety Authority” (EFSA), foram confirmados 3.159 casos de infecção por EHEC em 2008. Isso representou uma média de notificação de 0,7 casos por 100.000 habitantes, sendo os maiores índices encontrados na Irlanda (4,8 por 100.000), Suécia (3,3 por 100.000). A incidência em crianças menores de quatro anos correspondeu a 37,3% dos casos. Dos sorotipos identificados, os mais frequentemente isolados foram O157 (53%), O26 (5,3%) e O103 (2,8%). Foram acompanhados 146 casos de SHU, onde a maioria foi associada à infecções por *E. coli* O157 (56%). No mesmo ano, foram analisadas 3195 amostras de carne de frango para presença de EHEC e em nenhuma amostra foi encontrada a bactéria (EFSA, 2010).

Em dados compilados pelo CDC referentes a 2008, foram registrados 18.499 casos de infecções transmitidas por alimentos. Foi determinada a incidência de EHEC causada pelo sorotipo O157 de 1,12 por 100.000 habitantes e de 0,45 por 100.000 para os outros sorotipos (CDC, 2009). No mesmo ano, foram analisadas 11.230 amostras de carne bovina pelo serviço de inspeção daquele País e em 53% das amostras foi detectada a presença da bactéria. Grande aumento na incidência comparado aos anos anteriores, tendo sido detectada 14% em 2004, 18% em 2005, 20% em 2006 e 29% em 2007 (USDA, 2010b).

Nas pesquisas realizadas em alimentos no Brasil não foi detectada *E. coli* O157:H7. Silveira et al. (1999) analisaram 886 amostras de hambúrguer, Silva et al. (2001) analisaram 340 amostras de produtos cárneos e ambiente industrial, Silva et

al. (2003) analisaram 869 amostras de vegetais e em nenhuma destas pesquisas a bactéria foi encontrada. Em um estudo realizado na China, para determinar a prevalência de patógenos transmitidos por alimentos, *E. coli* O157:H7 também não foi detectada (CHAO et al., 2007).

## 2.6 *Salmonella* spp.

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Salmonella* inclui bacilos pequenos de 0,7 a 1,5 x 2,5 µm, Gram-negativos, são anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. Possuem antígenos somáticos, capsular e flagelares, sendo a maioria móvel com flagelos peritríquios, à exceção da *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*. A melhor faixa de temperatura para o crescimento das bactérias do gênero *Salmonella* é entre 37 °C e 40°C; fermentam a glicose e outros carboidratos com produção de ácidos e usualmente gás (BERCHIERI JR.; FREITAS NETO, 2009; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Dentre as características bioquímicas, as salmonelas são Voges-Proskauer, oxidase, indol e urease negativo e positivas nas provas de catalase, Vermelho de metila, sulfeto de hidrogênio, lisina e ornitina descarboxilase (ANDREATTI FILHO, 2009; COSTA; HOFER, 1972; LE MINOR; POPOFF, 1987).

### 2.6.1 Classificação e nomenclatura

A nomenclatura dos sorotipos evoluiu com o tempo. Os primeiros isolados da bactéria, eram consideradas diferentes espécies quando isoladas de diferentes quadros clínicos (*S. typhi*, *S. enteritidis*). Outros nomes estavam relacionados à síndrome e espécie especificidade (*S. abortus-ovis*, *S. abortus-equi*, *S. gallinarum-pullorum*) e errados em alguns casos (*S. cholerae-suis*, *S. typhi-murium*) (GRIMONT; WEILL, 2007; LE MINOR, POPOFF, 1987).

A análise sorológica dos antígenos O e H foi iniciada por White e continuada por Kauffmann. Para evitar confusões, começaram a ser utilizados como nomes os locais onde a bactéria representante do novo sorotipo teve o primeiro isolamento (*S. london*, *S. panama*). Estes nomes foram considerados erroneamente espécies e por isso eram escritos italizados. De fato, não tinham status taxonômico, eram utilizados para nomear bactérias frequentemente isoladas na medicina humana e veterinária.

Em outras espécies bacterianas, como *Escherichia coli*, não foram dados nomes aos sorotipo, que são apenas designados pela sua fórmula antigênica (GRIMONT; WEILL, 2007; LE MINOR, POPOFF, 1987).

Atualmente, com a utilização de técnicas de hibridização de DNA, apesar do número extremamente elevado de sorotipos, foram todos classificados como pertencentes a somente duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. A espécie *Salmonella enterica* foi dividida em seis subespécies: *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* e *Salmonella enterica* subsp. *indica* (EUZÉBY, 2008; GRIMONT; WEILL, 2007; LE MINOR; POPOFF, 1987; REEVES et al., 1989; TINDALL et al., 2008). Shelobolina et al. (2004) ao isolarem uma bactéria que possuía a sequência de DNA ribossômico 16S 96,4% similar à *Salmonella bongori* e 96,3% à *Enterobacter cloacae* propuseram uma nova espécie, *Salmonella subterranea*, e que foi validada em 2005 através da lista de validação nº 102 (EUZÉBY, 2005). Porém o Centro de Colaboração à OMS para Referência e Pesquisa em *Salmonella* (WHOCC-Salm) não reconhece essa bactéria como pertencente ao gênero (GRIMONT; WEILL, 2007)

Alguns sorotipos da subespécie *enterica* correspondem a mais de 99,5% dos isolados de *Salmonella* spp. e pela familiaridade e frequência de seu uso foram mantidos os nomes que os designava erroneamente como espécie. Esses nomes não foram mais italizados e passaram a ter a primeira letra maiúscula. Como exemplo, pode ser utilizada a nomenclatura *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium, como *Salmonella* Typhimurium ou ainda a fórmula antigênica como *Salmonella* I 1,4,[5],12:i:1,2. Convém destacar que para se utilizar a forma reduzida, o nome do gênero não deve ser abreviado, uma vez que isso só é possível quando este vem acompanhado do nome da espécie. Os sorotipos das outras subespécies e de *Salmonella bongori* são denominados exclusivamente pela fórmula antigênica (FIELDS, 2006; GRIMONT; WEILL, 2007).

Após a publicação do esquema de Kauffmann e White, em 1934, foram listados 44 sorotipos. Em 1964 o esquema já continha 958 sorotipos, em 1989 foram descritos 2267 e na última publicação do WHOCC-Salm foram listados 2579 sorotipos (GRIMONT; WEILL, 2007).

O antígeno O é designado por algarismos arábicos e caracteriza os sorogrupos de bactérias do gênero *Salmonella*, isso porque um mesmo antígeno O pode ser encontrado em vários sorotipos do referido gênero. Localiza-se na fração lipopolissacarídea (LPS) da membrana externa. O LPS é formado por um lipídeo, denominado lipídeo A e responsável pelo efeito tóxico do LPS, e uma cadeia polissacarídica de onde partem outras cadeias laterais monossacarídeas. As cadeias laterais são bastante específicas para as diferentes espécies de *Salmonella* spp. e caracterizam o antígeno O. Algumas cepas não possuem antígeno O e quando cultivadas em meios sólidos, formam colônias de aspecto irregular, por isso são chamadas cepas rugosas. Já foram descritos 67 antígenos O, que foram divididos formando 46 sorogrupos (CAMPOS, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008; GRIMONT; WEILL, 2007).

As salmonelas, com exceção da *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, possuem flagelos e são móveis. O flagelo é composto por uma estrutura proteica fixa na membrana celular e um flagelo que é formado por três porções. A porção média, o filamento flagelar, é o antígeno H. *Salmonella* spp. possui dois tipos de antígeno H, os de fase 1 e de fase 2. Os antígenos H de fase 1, são homólogos a outras bactérias entéricas, enquanto antígenos H de fase 2 são específicos do gênero *Salmonella*. Algumas possuem antígenos em uma só fase (monofásicas), porém a maioria possuem antígenos H nas duas fases (bifásicas). No total já foram descritos 119 tipos de antígenos H e são denominados por letras de “a” até “z”, ao acabar as letras, começou-se a utilizar z<sub>4</sub>, z<sub>6</sub>, z<sub>10</sub>, etc. Também existem antígenos H que são antigenicamente relacionados e descritos como complexos, estes possuem um antígeno em comum e outros antígenos secundários, como o complexo 1 (1,2; 1,5; 1,6, etc.) e complexo e<sub>n,x</sub>/e<sub>n,z</sub><sub>15</sub> (CAMPOS, 2005; FIELDS, 2006; GRIMONT; WEILL, 2007).

## **2.6.2 Patogênese, patologia e fatores de virulência**

A existência de grupos de genes e os componentes da estrutura de superfície das salmonelas são considerados fatores de virulência, que são responsáveis pela habilidade da bactéria em causar doença. Alguns destes componentes são o antígeno O, responsável pela liberação do LPS; fímbrias, que realizam a adesão da bactéria à célula hospedeira; antígeno H, que confere mobilidade à bactéria; e

outras proteínas que possuem funções como de adesão a regiões específicas do intestino e impedir a formação do complexo de ataque à membrana (CAMPOS, 2005).

Foram descritas dez regiões do genoma onde são localizados os genes de virulência, denominadas “*Salmonella* pathogenicity islands” (SPI) ou “ilhas de patogenicidade”. Também existem genes de virulência localizados nas chamadas “ilhotas de patogenicidade” e outros localizados em plasmídeos (ASTEN; DIJK, 2005; BERCHIERI JR.; FREITAS NETO, 2009; CAMPOS, 2005).

Para cada “ilha de patogenicidade” foram identificadas funções específicas no processo de infecção. A SPI-1 codifica um tipo de “microseringa” denominada sistema de secreção tipo três (SSTT), necessária no momento da infecção. A SPI-2 codifica outra proteína com a mesma função, porém quando a bactéria está no interior do fagossoma, além de outras proteínas que garantem a sobrevivência bacteriana no interior do fagossoma. SPI-3 também é importante na adaptação da bactéria no interior do fagossoma. SPI-4 e 9 são responsáveis pela codificação do sistema de secreção tipo um que secreta toxinas e SPI-5 contém genes que codificam proteínas envolvidas na secreção fluida e reação inflamatória da mucosa intestinal. SPI-6 e 10 possuem genes que codificam proteínas fimbriais, SPI-7 codifica o antígeno capsular e SPI-8 possui genes de resistência a bacteriocinas (ASTEN; BERCHIERI JR.; FREITAS NETO, 2009; DIJK, 2005; KISS et al., 2007).

Após ingestão, a bactéria passa por vários fatores de estresse como mudanças na osmolaridade, pH, concentração de oxigênio e isso é fator desencadeante da transcrição de genes importantes na infecção. Ao chegar no intestino, a bactéria se adere às células M e enterócitos através das fímbrias. Através do SSTT injeta no citosol proteínas que promovem mudanças nos sistemas de transdução de sinal da célula determinando rearranjos no citoesqueleto, resultando na interiorização da bactéria pela célula através de um fagossoma. Uma vez dentro da célula, a bactéria se multiplica intensamente e injeta no citosol mais proteínas, liberando proteínas inflamatórias e outras que impedem a fusão do fagossoma com os lisossomos e o transporta para região baso-lateral da célula, onde é liberada. Com isso, fatores de sinalização celular são liberados e há migração de monócitos e macrófagos que chegam para tentar controlar a infecção. As interações da salmonela com as células intestinais, infiltração e a transmigração de células de defesa ocasionam a liberação de diversas citocinas que resultam em

inflamação da mucosa intestinal, exsudação de líquido seroso e diarreia, caracterizando uma enterite. As salmonelas são fagocitadas, porém resistem aos fagossomas e, assim, quando as células de defesa retornam aos locais de apresentação de antígeno, acabam transportando a bactéria a órgãos distantes, caracterizando a infecção sistêmica (CAMPOS, 2005; BERCHIERI JR.; FREITAS NETO, 2009; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### 2.6.3 Ocorrência em humanos

A doença causada no homem irá depender de diversos fatores, como sorotipo envolvido, idade, estado imunológico, se existem infecções concomitantes e dose infectante. Quanto à patogênese, as salmonelas podem ser divididas em dois grupos: o primeiro representado pela *Salmonella* Typhi e as salmonelas paratíficas; o segundo representado pelos outros sorotipos. O primeiro grupo determina no homem a febre tifoide e paratifoide, infecção sistêmica que se inicia na mucosa intestinal, praticamente não ocorrendo inflamação neste ponto, e progride alcançando os órgãos internos. O segundo grupo determina no homem gastroenterite, podendo em alguns casos vir acompanhada de bacteremia (CAMPOS, 2005; TROLLER, 1976).

Geralmente causa no homem diarreia, febre, cefaléia, náuseas e dores abdominais entre 12 e 72 horas pós-infecção, pode durar de 4 a 7 dias e a maioria das pessoas se recupera sem tratamento específico (CAMPOS, 2005; CDC, 2008).

Contudo, em alguns casos a diarreia pode ser severa e necessária hospitalização dos pacientes. Nestes casos, geralmente ocorre septicemia, podendo causar morte a menos que a pessoa seja prontamente atendida. Idosos, crianças e pessoas imunodeprimidas têm maior probabilidade de desenvolver o quadro mais severo da doença (CDC, 2008).

Considera-se a dose infectante de  $10^6$  bactérias, porém irá depender muito dos mecanismos de defesa do indivíduo, inespecíficos e específicos, e das características do alimento envolvido. Em alimentos com alto teor lipídico, os glóbulos de gordura “protegem” as bactérias das enzimas digestivas e acidez gástrica e, neste caso, doses infectantes de 15 células viáveis podem desencadear a doença (FDA, 2010a; FRANCO ; LANDGRAF, 2008; HUMPHREY, 2004).

Em estudo realizado no Instituto Adolf Lutz analisando 5.490 cepas de *Salmonella* spp. isoladas entre 1991 e 1995, de infecções humanas (2.254 cepas) e de materiais de origem não humana (3.236 cepas), foi evidenciado aumento significativo na participação da *Salmonella* Enteritidis. Deste modo, em 1991 o sorotipo correspondeu a 1,2% das cepas de *Salmonella* isoladas, 2% em 1992, 10,1% em 1993, 43,3% em 1994 e 64,9% em 1995. Este aumento verificado a partir de 1993 esteve associado à ocorrência de surtos de diarreia veiculados por alimentos (EDUARDO et al., 2008). Em estudo posterior, foram analisados os sorotipos encontrados de 3554 cepas isoladas de amostras humanas entre 1996 e 2003, o percentual de cepas de *Salmonella* Enteritidis foi de 67,4%, seguida de *Salmonella* Typhimurium com 5,2% (FERNANDEZ et al., 2006).

Em estudo feito pelo Centro de Vigilância Epidemiológica, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, com base em notificações de surtos e levantamento de diagnóstico laboratorial, no período de 1999 a 2007, foi demonstrado que grande parte dos surtos de diarreia causados por bactéria no Estado de São Paulo ocorreram devido à *Salmonella* spp., sendo que a *Salmonella* Enteritidis representou 43,2% desses surtos. A incidência foi alta em crianças de cinco a nove anos de idade, 2,44 casos por 100.000 habitantes, e no grupo de 10 a 19 anos, 2,15 casos por 100.000 habitantes (DDTHA, 2008).

Em Hong Kong, dados compilados de 2000 a partir do Programa de Monitoramento de *Salmonella* spp., demonstraram 2.039 isolados a partir de pessoas, portanto, uma incidência de 28,6 por 100.000 habitantes (YEUNG; KAM, 2001).

Nos EUA foram registrados 40.666 casos onde houve isolamento de *Salmonella* spp. nos laboratórios de Saúde Pública, significando uma incidência de 13,6 por 100.000 habitantes no País. A faixa de idade mais afetada foi a de crianças com menos de cinco anos, representando 24% dos casos (CDC, 2008).

Em 2008 um total de 131.468 casos de salmonelose foram confirmados na União Europeia, significando uma incidência de 26,4 casos por 100.000 habitantes. A Eslováquia (126 por 100.000) e República Tcheca (103 por 100.000) foram os países que apresentaram maior incidência da doença, enquanto Itália, Espanha, Grécia, Portugal e Romênia tiveram taxas de até 10 casos por 100.000 habitantes. Também verificou-se notificações com frequência muito maior no grupo de idade de zero a quatro anos (125,4 por 100.000) (EFSA, 2010).

#### 2.6.4 Ocorrência em aves e produtos derivados

No passado, a salmonelose aviária era tida principalmente como preocupação por perdas de produção e da saúde das aves, posteriormente, o enfoque maior foi em saúde pública, tornando-a a doença bacteriana de maior impacto econômico na avicultura brasileira e mundial. Entre todas as espécies animais, a presença de *Salmonella* spp. é mais frequentemente descrita em aves e seus produtos, em razão da alta população de risco, dos intensos controles pelas agroindústrias e instituições no isolamento e identificação da bactéria (ANDREATTI FILHO, 2009). Por isso, são frequentes os casos de surtos de infecção humana relacionados à ingestão de produtos de origem avícola contaminados e/ou indevidamente preparados (CDC, 2008; DDTHA, 2008; ANDREATTI FILHO, 2009; ECDC, 2009).

A carne de aves pode ser contaminada com *Salmonella* spp. quando a bactéria é transferida do conteúdo intestinal à carcaça através do processamento industrial ou mesmo através de sua disseminação no corpo do animal pela corrente sanguínea, alcançando diversos órgãos (ANDREATTI FILHO, 2009).

Um extenso levantamento epidemiológico foi realizado por Hofer et al. (1997) que analisaram os sorotipos encontrados entre 1962 e 1991, a partir de isolamentos de *Salmonella* spp. em aves, principalmente de *Gallus gallus* (82,71%). Encontraram como os sorotipos mais frequentes nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, respectivamente, *Salmonella* Gallinarum (143/571; 34/114; 31/59), *Salmonella* Pullorum (249/571; 24/114; 7/59) e *Salmonella* Typhimurium (41/571; 14/114; 19/59). No estado de Santa Catarina, os sorotipos mais frequentemente isolados foram *Salmonella* Typhimurium (253/886), *Salmonella* Heidelberg (159/886) e *Salmonella* Enteritidis (104/886).

Santos et al. (2000) em pesquisa realizada com carcaças de frango comercializadas no varejo de Jaboticabal/SP, encontraram 32% (48/150) positivas para *Salmonella* spp. Entre os sorotipos mais comumente identificados estavam *Salmonella* Enteritidis (60,4%) e *Salmonella* Schwarzengrund (8,3%), e entre outros *Salmonella* Anatum (2,1%). Cardoso et al. (2005) detectaram *Salmonella* spp. em 20,7% (6/29) das carcaças de frango coletadas abatedouro avícola localizado no Estado de São Paulo.

Andreatti Filho et al. (2001) ao analisarem os sorotipos isolados de bactérias do gênero *Salmonella* de galinhas e materiais de origem avícola, encontraram

*Salmonella* Enteritidis em 46,6% e *Salmonella* Anatum em 6,8% de um total de 73 isolados. Outros sorotipos foram isolados com menor frequência como *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Montevideo e *Salmonella* Pullorum.

Em pesquisa realizada no Estado de Goiás, para determinação da quantidade de lotes contaminados já no nascimento, Rocha et al. (2003) encontraram dez dos 18 (55,56%) lotes estudados com a presença da bactéria, sendo os sorotipos encontrados *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg. No mesmo estado, Rezende et al. (2005) analisaram 96 carcaças, sendo 19 (19,8%) positivas para o gênero *Salmonella*. O sorotipo Enteritidis foi o mais frequentemente isolado, representando 63,1% do total. No Estado do Ceará, Oliveira (2004) encontrou 11,8% das carcaças analisadas contendo a bactéria. Cortez (2006) encontrou 22,2% (8/36) de carcaças contaminadas por *Salmonella* spp. no Estado de São Paulo. No Mato Grosso do Sul, Boni (2007) obteve 19,51% (24/123) das amostras coletadas em abatedouro, positivas para *Salmonella* spp. No Rio Grande do Sul, Ribeiro et al. (2007) obtiveram 39,3% (24/61) das amostras coletadas positivas para presença *Salmonella* spp. em cortes de frangos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária implementou o Programa Nacional de Monitoramento e da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF) em 2004, tendo sido concluído em 2006. Neste levantamento, avaliou-se a presença de bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Enterococcus* em carcaças de frangos, identificação das espécies e sorotipos e o perfil de resistência bacteriana dos isolados. Foi analisado um total de 2710 carcaças em todos os Estados, tendo sido verificada *Salmonella* em 4% das amostras. Os Estados com maior incidência da bactéria foram São Paulo com 7,78% (26/334), Alagoas com 5,26% (9/171), Rio Grande do Sul com 4,65% (8/172), Minas Gerais com 1,69% (3/177) das carcaças contaminadas (BRASIL, 2008).

Levantamento semelhante foi realizado pela Autoridade Europeia em Segurança dos Alimentos (“European Food Safety Authority” - EFSA) por meio de um estudo de prevalência de *Salmonella* spp. nos plantéis avícolas comerciais de corte e postura dos países europeus. A presença de bactérias do gênero *Salmonella* foi detectada em 20,3% (1448/7120) dos lotes de frangos de corte analisados. A prevalência variou de 0% na Suécia a 68,2% na Hungria, tendo também sido observada alta prevalência na Polônia (58,2%), Portugal (43,5%) e Espanha (41,2%) (EFSA, 2007a). Em poedeiras comerciais a prevalência de *Salmonella* spp. foi de

29,7% (1.486/5.007), tendo tido prevalências variando entre 0% em Luxemburgo e Suécia e 79,5% em Portugal (EFSA, 2007c). Analisando os resultados compilados de análises realizadas em diversos alimentos de origem avícola, obtidos em matadouros ou no comércio, foi detectada a presença de bactérias do gênero *Salmonella* em 4,22% (2480/58.730) dos produtos (EFSA, 2010).

Na relação entre os sorotipos de *Salmonella* identificados em alimentos e em casos de diarreia em pessoas na Tailândia, foi observado que na carne de frango o sorotipo mais isolado foi *Salmonella* Enteritidis, em camarões congelados foi *Salmonella* Weltevreden e em comida tailandesa os sorotipos Derby e Anatum. Dos 18.722 isolados de materiais clínicos de pacientes, os sorotipos predominantes foram *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Weltevreden, *Salmonella* Derby e *Salmonella* Anatum. Foi estabelecida uma relação direta entre a ingestão dos produtos contaminados e a ocorrência de doença em humanos (Boonmar et al., 1998).

Em um estudo realizado na Índia, 14,7% (34/231) dos suabes de cloaca obtidos de aves com diarreia foram positivos para *Salmonella* spp. (MURUGKAR et al., 2005). Analisando carcaças importadas provenientes do mesmo país, Dahal (2007) encontrou em bactérias do mesmo gênero em 13% das carcaças analisadas.

Apesar de *Salmonella* spp. ter sido isolada de produtos avícolas e meios de processamento, como água de “chiller”, em vários trabalhos (ANDREATTI FILHO et al., 2001; BONI, 2007; BRASIL, 2008; CORTEZ, 2006; DAHAL, 2007; HOFER et al., 1997; OLIVEIRA, 2004; REZENDE et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007; ROCHA et al., 2003; SANTOS et al., 2000), pouco se conhece sobre sua presença em pés de frango destinadas ao consumo humano.

### **2.6.5 Eliminação de *Salmonella* spp. pelo calor**

Em 1996 o USDA através do FSIS, propôs um padrão para produtos tratados termicamente no qual os produtos deveriam ser submetidos à temperaturas capazes de reduzir a contaminação por *Salmonella* spp. em 7 log<sub>10</sub> (FSIS, 1996). Utilizando dados do FSIS, estimaram um valor de 6,7 log<sub>10</sub> por 143 gramas para o “pior caso”, ou seja, um produto contaminado teria no máximo 6,7 log<sub>10</sub> de salmonela por 143 gramas de alimento, justificando o padrão estabelecido (FSIS, 1998). Com isso, em 1999 o FSIS implementou a nova regra da redução de *Salmonella* spp. em 7

$\log_{10}$  como proposto em 1996. O FSIS então fez um pedido ao “Agricultural Research Service” para realizar um estudo determinando os valores de tempo e temperatura necessários para que a redução  $7 \log_{10}$  de *Salmonella* spp. fosse alcançada (FSIS, 2010a). O trabalho foi publicado em 2001 por Juneja et al., tendo sido elaboradas tabelas para cada teor de gordura com diversas temperaturas utilizadas. Dentre as quais, com teor de gordura de 1% e 12% a  $65^{\circ}\text{C}$  foram necessários 3,5 e 4,9 minutos, respectivamente. Com os mesmos teores de gordura a uma temperatura de  $71,1^{\circ}\text{C}$  os tempos necessários para conseguir a redução foram de 13,7 e 16,9 segundos, respectivamente (JUNEJA et al., 2001).

Outros estudos foram realizados para identificar o efeito da temperatura sobre *Salmonella* spp. como forma de eliminação da bactéria em carne de frango. Para isso, utilizou-se um cálculo que determina o valor D, tempo necessário para redução de 90% ( $1 \log_{10}$ ) na contagem bacteriana a uma determinada temperatura. Mazzota (2000) observou que a uma temperatura de  $63^{\circ}\text{C}$  o valor D foi 11 segundos, ou seja, para que houvesse redução de  $7 \log_{10}$ , seriam necessários 1,26 minutos. Ao utilizar a temperatura de  $71,1^{\circ}\text{C}$ , o mesmo efeito foi conseguido em 3 segundos. Murphy et al. (2000) encontrou valores D para  $65^{\circ}\text{C}$  de 1,16 minutos e para  $70^{\circ}\text{C}$  de 14 segundos, ou seja, para redução de  $7 \log_{10}$  seriam necessários 8,12 e 1,67 minutos, respectivamente.

Observando que diversos fatores alteravam a resistência bacteriana à temperaturas elevadas, Juneja et al. (2003) estudaram a influência de diversos meios contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio, fosfato de sódio e lactato de sódio na resistência térmica de um pool feito a partir de 8 sorotipos de *Salmonella* spp. isolada de diversas origens, inclusive carne de frango. Os resultados foram apresentados em tempo necessário para redução de  $6,5 \log_{10}$  na contagem bacteriana. À temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$  foram encontrados tempos entre 1,6 a 10,07 minutos e à temperatura de  $71,1^{\circ}\text{C}$  valores entre 0,40 a 1,12 minutos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas dos pés de frango foram realizadas em Matadouro de Aves e Coelhos sob o Serviço de Inspeção Federal (SIF), no Estado de Minas Gerais.

Para realização das análises quantitativas (Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis, Número Mais Provável de Coliformes Totais e Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes), foram coletados 80 pés de frangos de corte de 20 lotes distintos, em cinco coletas de 16 pés cada uma. As coletas dos pés de frango foram realizadas em quatro etapas do processamento: no início, após o corte na articulação tíbia-metatarso (P1); após escaldagem a 71°C nas três primeiras coletas e a 65°C nas demais, durante 28 segundos e após retirada da cutícula (P2); na saída do “chiller”, após o pré-resfriamento (P3); e a última, sob congelamento a uma temperatura de aproximadamente -30°C (P4). Os pés coletados foram acondicionados em sacos estéreis para “Stomacher”, lacrados, identificados pelo lote e pela etapa do processamento e colocados em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

Para as análises qualitativas (pesquisa de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp.), foram coletados 600 pés e acondicionados em sacos plásticos para embalagem primária dos produtos, em duas das etapas do processamento citadas. De cada um dos 20 lotes estudados foram coletados 15 pés, logo após o corte na articulação tíbia-metatarso (P1) e 15 pés, após o congelamento (P4). Os pés resfriados e congelados foram transportados em caixas isotérmicas separadas contendo gelo reciclável. A amostragem de 15 pés por lote por etapa foi baseada em um plano de três categorias estabelecido pelo “Food and Drug Administration” (FDA)

dos EUA. Os pés de frango foram classificados na categoria três, de “alimentos que são normalmente sujeitos a processos letais para *Salmonella* entre o momento da amostragem e do consumo”. Neste plano de amostragem, até 15 unidades analíticas podem ser agrupadas e testadas como uma única amostra (ANDREWS et al., 2001).

Todos os pés coletados foram transportados até o Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Veterinária da UFF onde foram realizadas as análises.

## 3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

### 3.2.1 Análises quantitativas

Toda a manipulação das amostras foi realizada em câmara de fluxo laminar, previamente limpa e desinfetada com álcool a 70% e submetida à luz ultravioleta durante 30 minutos. Com bico de Bunsen ligado, de cada pé foi retirada uma fração de 25 gramas e retornada à embalagem de origem, onde foram adicionados 250mL de solução salina peptonada 1% tamponada (SSP). A rinsagem da amostra foi realizada com agitação manual durante um minuto e em seguida foram realizadas as diluições subsequentes de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ , em água peptonada a 0,1%, homogeneizadas em agitador automático de tubos.

#### 3.2.1.1 Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis

Foi inoculado 1mL de cada diluição, previamente preparada, em Ágar padrão para contagem (APC) segundo composição básica (BRASIL, 2003b) e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C por 48 horas.

Para a obtenção do número ideal de colônias por placa para a contagem entre 25 e 250 colônias, foi utilizada uma faixa de diluição da amostra de acordo com a etapa do processamento. Assim, para análise de P1 foram utilizadas as diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  para P2 e P3, foram utilizadas as diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  e para P4, foram utilizadas diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ .

### 3.2.1.2 Número Mais Provável de Coliformes Totais e Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes

Para a realização da prova presuntiva, a SSP utilizada na rinsagem dos pés (SSPr) foi diluída e inoculada em séries de três tubos para cada diluição, previamente identificados, contendo Caldo lauril sulfato (LST), confeccionado no laboratório segundo legislação (BRASIL, 2003b). Para cada fase de processamento as seguintes diluições foram utilizadas as seguintes diluições: P1 ( $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ ), P2 e P3 ( $10^{-0}$  a  $10^{-3}$ ) e P4 ( $10^{-0}$  a  $10^{-2}$ ). Para preparar a solução  $10^{-0}$ , tubos de ensaio com 10mL de LST em concentração dupla foram inoculados com 10mL da SSPr. Depois de inoculados, os tubos eram homogeneizados em agitador de tubos e incubados em estufa bacteriológica  $36^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Após o período de incubação, foram anotados os resultados e aqueles tubos com formação de gás no interior do tubo de Durham, foram considerados positivos e reservados. A partir de cada tubo positivo na prova presuntiva, foi inoculado um tubo correspondente com 10mL de Caldo verde brilhante bile lactose 2% (VBBL) (Himedia) e outro com 10mL de Caldo *Escherichia coli* (EC) (Himedia), com uma alça calibrada em 0,1mL e agitados. O Caldo VBBL foi incubado em estufa bacteriológica a  $36^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, enquanto o Caldo EC foi incubado em banho-maria a  $45^{\circ}\text{C}$ , pelo mesmo período. Após a incubação foram registrados os tubos positivos em tabela própria e calculados os resultados conforme a orientação da legislação (BRASIL, 2003b).

### 3.2.2 Análises qualitativas

Os pés coletados em P1 e P4 foram processados em amostras constituídas por “pools” de 15 unidades. Em câmara de fluxo laminar foi colocada uma cuba previamente higienizada e desinfetada com álcool a 70%, sendo colocado saco plástico idêntico ao utilizado na coleta das amostras. O saco plástico com as amostras foi desinfetado externamente com álcool a 70% e cortado na parte inferior com tesoura estéril para liberação dos pés no novo saco plástico. Foram adicionados 400 mL de SSP no saco plástico, amarrado e agitado durante um minuto. Em seguida o saco plástico foi desinfetado externamente e cortado com tesoura previamente flambada, recuperando SSPr.

### 3.2.2.1 Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7

Para análise dos pés coletados em P1 foram feitas três diluições ( $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ ) a partir da SSPr e inoculadas alíquotas de 1mL em tubos de ensaio com Caldo BHI (Mikrobiologie) previamente identificados. Para P4, foi realizada uma diluição 1:2 com 10mL de SSPr em 10mL de Caldo BHI em concentração dupla e outra diluição  $10^{-1}$ . Os tubos com Caldo BHI foram incubados a 36°C durante três horas para recuperação das bactérias.

Após o período de incubação, em câmara de fluxo laminar e com bico de Bunsen ligado, os tubos foram agitados em agitador automático de tubos. Foi semeada, por esgotamento, uma placa para cada diluição, contendo Ágar MacConkey base (Himedia) adicionado de sorbitol (Vetec) (MACS). Todas as placas foram previamente identificadas e após semeadura, incubadas na posição invertida em estufa bacteriológica a 36°C durante 24 horas.

De cada amostra em MACS foram selecionadas até 10 colônias translúcidas para realização das provas bioquímicas. As colônias selecionadas eram repicadas em “Triple Sugar Iron Agar” (TSI) (Himedia). Aquelas que apresentaram comportamento bioquímico compatível de *E. coli* em TSI, com base e inclinação amarelos, sem H<sub>2</sub>S e produção de gás, foram repicadas em “Lisine Iron Agar” (LIA) (Himedia), Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM) (Oxoid) e Ágar Citrato (Biobrás). Os isolados que apresentaram o perfil bioquímico sugestivo de *E. coli*, com base e inclinação violeta, sem H<sub>2</sub>S no LIA, produção de indol, com motilidade e sem H<sub>2</sub>S no SIM e utilização do citrato virando o meio de verde à cor azul no Ágar Citrato, foram inoculados em Ágar Nutriente e incubados a 36°C durante 24 horas. Após este período, a prova sorológica foi realizada pela diluição do crescimento em Ágar Nutriente, coletado com alça de platina, em Solução salina fosfatada tamponada pH 7,2 e adicionado antissoro O157 em lâmina de vidro. As amostras positivas, com formação de grumos, foram separadas e enviadas ao Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, para identificação do antígeno somático O e identificação do antígeno flagelar H7.

### 3.2.2.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foram utilizados os frascos contendo SSPr para o pré-enriquecimento, incubados em estufa bacteriológica a 36°C durante 16 a 20 horas.

Para o enriquecimento seletivo, foram semeados 1mL da solução pré-enriquecida em um tubo de ensaio contendo 10mL de Caldo Selenito-Cistina (Micromed) e em outro, contendo 10mL Caldo Tetrionato (Mikrobiologie). Estes tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 36°C durante 24 horas.

Após o enriquecimento seletivo, foi realizado o plaqueamento por esgotamento nos meios sólidos, Ágar bile peptona lactose sacarose (BPLS) (Himedia) e Ágar Salmonella Diferencial (SD) (Himedia), de cada caldo de enriquecimento seletivo e incubados em estufa bacteriológica a 36°C durante 24 horas.

As características das colônias que cresceram em cada meio foram registradas em planilha própria. Foram selecionadas três colônias daquelas que apresentaram coloração e morfologia compatíveis com *Salmonella* spp. em cada meio, ou seja, translúcidas em BPLS e róseas em SD, e separadas para a realização dos testes bioquímicos.

As colônias selecionadas foram semeadas em TSI e LIA e incubadas a 36°C por 24 horas para triagem bioquímica. As cepas que apresentaram características do gênero *Salmonella*, com base amarela, inclinação vermelha e com H<sub>2</sub>S no TSI, com base e inclinação violetas com H<sub>2</sub>S no LIA, foram inoculadas em Ágar SIM e Ágar Fenilalanina (Difco), novamente incubadas nas mesmas condições. Aquelas compatíveis bioquimicamente, sem produção de indol, com H<sub>2</sub>S e motilidade no SIM e sem desaminação de fenilalanina no Ágar Fenilalanina, foram registradas e semeadas em Ágar Nutriente, incubadas em estufa bacteriológica a 36°C durante 24 horas, para realização da prova sorológica com antissoro polivalente contra *Salmonella* spp. (Probac do Brasil). As amostras que reagiram ao antissoro formando grumos foram separadas, identificadas e enviadas ao Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, para confirmação e identificação do sorotipo.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados de CPMM, CT e CTT, expressos em logaritmos na base 10 ( $\log_{10}$ ), foram submetidos à análise não-paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância, para comparação das médias de contaminação pelos diferentes indicadores nas quatro etapas do processamento analisadas. Seguida do teste de Dunn para diferenciação entre as etapas.

As chances de contaminação por *Salmonella* spp. nas etapas do processamento P1 e P4 foram quantificadas por meio do cálculo de razão de chances (“Odds Ratio” - OR) e respectivo intervalo de confiança a 5% de significância.

Foi utilizado o programa InStat, versão 2.05<sup>a</sup> (GraphPad Software, 1994) em todas as análises estatísticas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISES QUANTITATIVAS

Na CPMM verificou-se que houve diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) entre as médias obtidas para as amostras coletadas no início do processamento (P1) e as obtidas nas demais etapas (P2, P3 e P4). Isso significa que o nível de contaminação diminuiu após o processamento (Tabela 1).

**Tabela 1** Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis (CPMM) das amostras de pés coletados em quatro etapas do processamento\* ( $\log_{10}$  UFC/g).

Etapas do Processamento*	CPMM			Valor Mínimo	Valor Máximo
	Média $\pm$ Desvio Padrão	Mediana	Valor		
P1	7,10 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	5,81	5,14	8,04	
P2	5,65 $\pm$ 1,08 <sup>b</sup>	2,99	1,95	6,94	
P3	4,98 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	3,65	2,68	6,13	
P4	3,67 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	3,14	2,43	4,33	

\*P1 – no início, após o corte na articulação tíbia-metatarso; P2 - após a escalda e retirada da cutícula; P3 - após o pré-resfriamento; P4 – no final, após o congelamento.  
ANOVA/Dunn,  $p < 0,05$ , a, b = letras diferentes expressam diferenças significativas

As médias de CT foram mais altas no início do processamento dos pés antes da escaldagem (P1). Verificou-se que houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre a etapa P1 e P4, e destas para as demais. Após a escaldagem (P2) e na saída do “chiller” (P3), as médias decresceram, mas não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) entre si (Tabela 2).

**Tabela 2** Número Mais Provável de Coliformes Totais (CT) nas amostras de pés coletados em quatro etapas do processamento\* ( $\log_{10}$  UFC/g).

Etapas do Processamento*	CT			
	Média $\pm$ Desvio Padrão	Mediana	Valor Mínimo	Valor Máximo
P1	6,19 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>	5,04	3,48	7,04
P2	3,75 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	0,97	0,36	5,04
P3	2,52 $\pm$ 0,88 <sup>b</sup>	1,50	0,36	3,67
P4	0,57 $\pm$ 0,43 <sup>c</sup>	0,46	-0,44	0,97

\*P1 – no início, após o corte na articulação tíbia-metatarso; P2 - após a escalda e retirada da cutícula; P3 - após o pré-resfriamento; P4 – no final, após o congelamento.  
ANOVA/Dunn,  $p < 0,05$ , a, b = letras diferentes expressam diferenças significativas

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias de CTT obtidas nas amostras coletadas em P1 e as obtidas nas outras etapas. A média obtida para as amostras coletadas após a escaldagem (P2) não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) das obtidas na saída do chiller (P3) ou após congelamento (P4). As médias de CTT após o congelamento foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) e menores que as obtidas no início do processamento (P1) e na saída do chiller (P3) (Tabela 3).

As médias de CTT (Tabela 3) foram ligeiramente menores que as obtidas no CT (Tabela 2).

**Tabela 3** Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes (CTT) das amostras de pés coletados em quatro etapas do processamento\* ( $\log_{10}$  UFC/g).

Etapas do Processamento*	CTT			
	Média $\pm$ Desvio Padrão	Mediana	Valor Mínimo	Valor Máximo
P1	5,83 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup>	5,04	3,18	6,87
P2	3,74 $\pm$ 1,21 <sup>b,c</sup>	0,96	-0,52	5,04
P3	2,11 $\pm$ 0,94 <sup>b</sup>	1,36	-0,04	3,04
P4	0,38 $\pm$ 0,46 <sup>c</sup>	-0,04	-0,52	0,97

\*P1 - após o corte na articulação tíbia-metatarso; P2 - após a escaldagem e retirada da cutícula; P3 - após o pré-resfriamento; P4 – após o congelamento.  
ANOVA/Dunn,  $p < 0,05$ , a, b = letras diferentes expressam diferenças significativas

## 4.2 ANÁLISES QUALITATIVAS

### 4.2.1 Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7

Das amostras coletadas em P1 foram selecionadas 173 colônias para a caracterização bioquímica. Destas, 17 cepas tiveram comportamento bioquímico compatível com *E. coli* e após o teste de aglutinação frente a antissoro O157, duas cepas apresentaram resultado positivo, entretanto nenhuma foi confirmada como O157:H7 pelo Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Das amostras coletadas em P4, foram selecionadas 29 colônias e nenhuma apresentou comportamento bioquímico típico da bactéria pesquisada.

### 4.2.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Dos 20 lotes investigados nas etapas P1 e P4 para a presença de *Salmonella* spp., a análise não foi possível em um dos lotes. Foram positivos 68,42% (13/19) dos lotes restantes analisados (Tabela 4).

Dos 13 lotes positivos, foi encontrada *Salmonella* spp. em 13 (68,42%), a partir das amostras coletadas em P1, e em uma (5,26%) amostra de P4, lote este que também foi positivo em P1 (Tabela 4). O valor do risco por OR foi 39,00 ( $P < 0,05$ ), o que significa que a chance de haver presença da bactéria em P1 foi 39 vezes maior que em P4 (IC= 4,17 a 363,64).

**Tabela 4** Pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de pés de frango coletados em duas etapas\* do processamento tecnológico em Matadouro de Aves e Coelhos

"Pools" de pés de frango	Etapa do Processamento		Total
	P1	P4	
Positivos	13/19 (68,42%)	1/19 (5,26%)	14/38 (36,85%)
Negativos	06/19 (31,58%)	18/19 (94,74%)	24/38 (63,15%)
<b>Total</b>	19/19 (100%)	19/19 (100%)	38/38 (100%)

\*P1 - após o corte na articulação tíbia-metatarso; P4 - após o congelamento.  
OR=39, P=0,0001 (IC=4,17 a 363,64)

O sorotipo Schwarzengrund foi encontrado em 12 dos 19 lotes estudados e *Salmonella* Anatum e *Salmonella* Corvallis foram identificados em um dos lotes em P1 (Tabela 5).

**Tabela 5** Sorotipos de *Salmonella* spp. identificados em amostras de pés de frangos de corte no início e no final do processamento tecnológico\* em Matadouro de Aves e Coelhos sob Inspeção Sanitária

Sorotipos de <i>Salmonella</i> spp.	Etapa do processamento* (n° de isolados)	
	P1	P4
Schwarzengrund	33	03
Anatum	01	00
Corvallis	01	00
Total	35	03

\*P1 – início do processamento, após o corte na articulação tíbia-metatarso; P4 – final do processamento, após o congelamento.

## 5 DISCUSSÃO

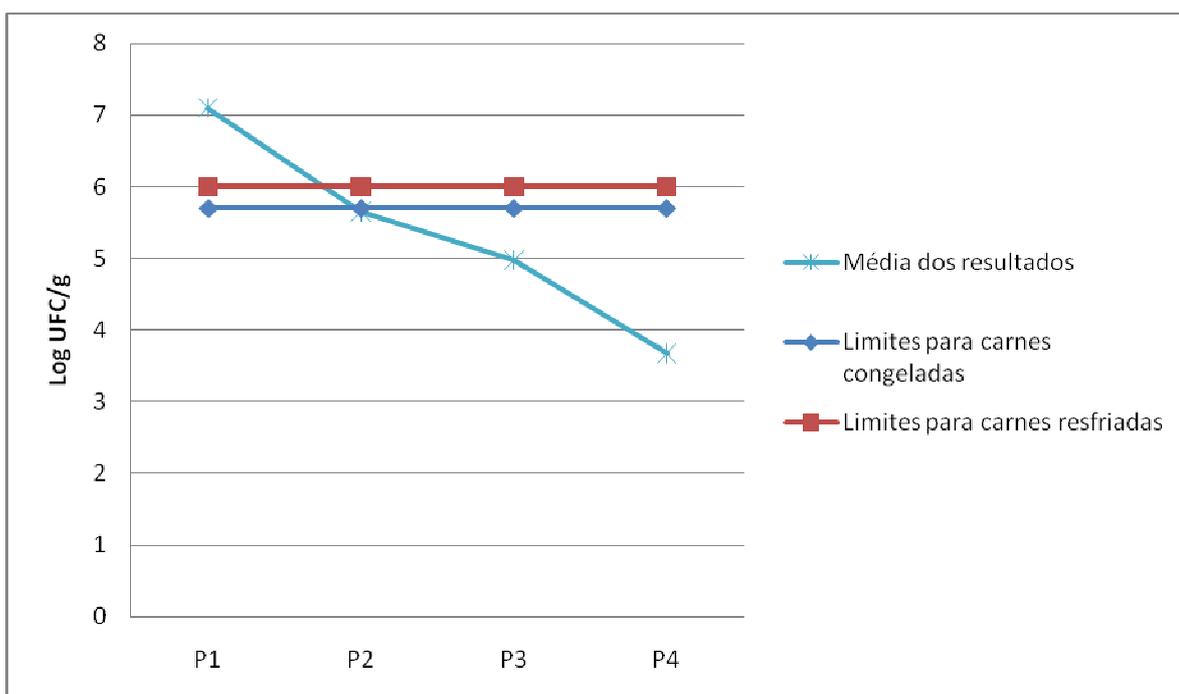
Os resultados obtidos no presente estudo bacteriológico, o primeiro realizado em pés destinados ao consumo humano como alimento no Brasil, corroboram com os apresentados por Bilgili et al. (2003) nos EUA no único trabalho prévio de avaliação microbiológica de pés de frango processados para consumo humano, que creditou os baixos índices de contaminação provavelmente pelo processamento tecnológico ao qual os pés são submetidos.

Os resultados encontrados para pés de frango antes da escaldagem foram similares aos encontrados por Kotula e Pandya (1995).

Os valores encontrados nas CPMM para os pés de frango após o pré-resfriamento (P3) foram similares quando comparados aos valores encontrados em carcaças por Kim (1998) e Maroso (2008). Entretanto, quando comparados aos valores encontrados nas etapas após escaldagem (P2) e pré-resfriamento (P3), foram inferiores aos resultados obtidos nos trabalhos de Galhardo et al. (2006) e Lopes et al. (2007) com carcaças. Essa diferença, entre os resultados obtidos nas análises de pés e carcaças, pode ser creditada às diferenças no processamento tecnológico destes produtos. No processamento das carcaças há maior predisposição à contaminação, pois, após a escaldagem, pode ocorrer recontaminação, principalmente devido ao rompimento de vísceras durante evisceração, demonstrada por Kim (1998). No presente estudo foi verificado que após o corte, o processamento a que os pés foram submetidos resultaram em redução significativa na contaminação (Figura 1). Foi demonstrada diferença estatística entre a etapa P1 e as demais etapas do processamento, com uma redução entre P1 e P4.

Não existe legislação no Brasil para regulamentar o limite máximo para o número de microrganismos aeróbios mesófilos em carne de aves, porém a legislação da

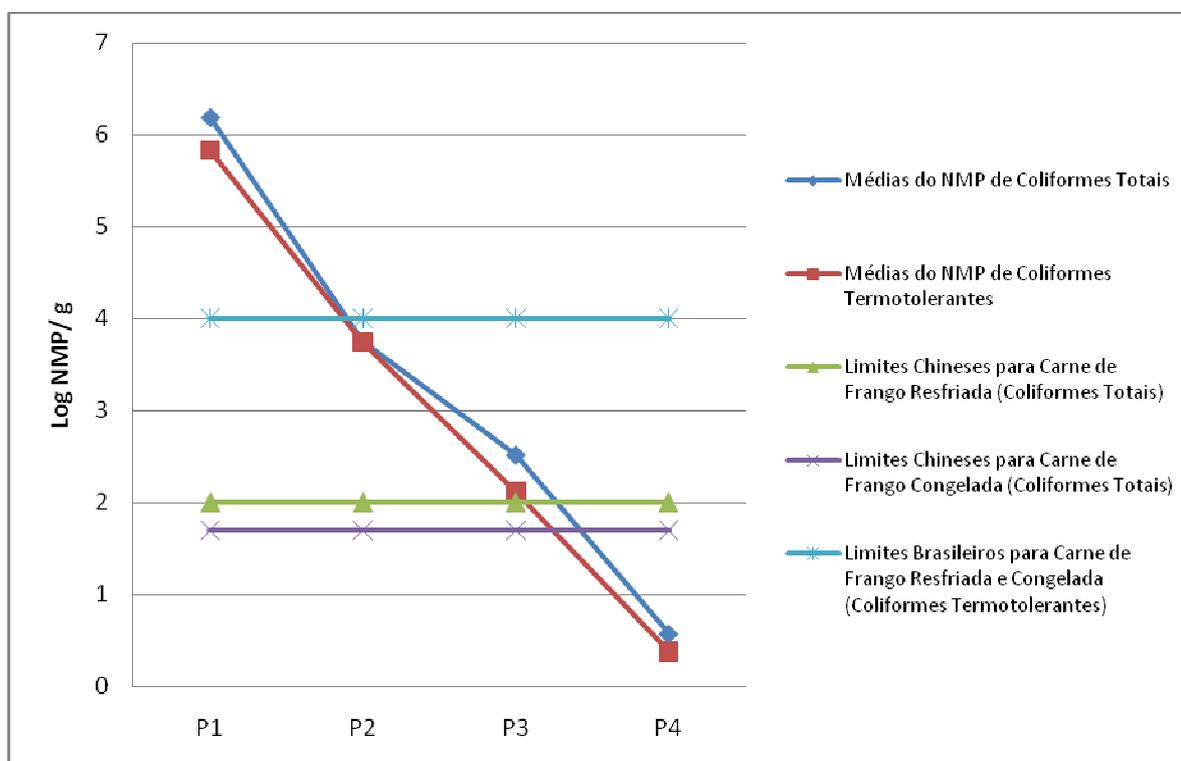
China, principal comprador internacional de pés de frango, define um limite máximo de  $1,0 \times 10^6$  (UFC/g) para cortes avícolas resfriados e de  $5,0 \times 10^5$  (UFC/g) para congelados, citada por Bugang (2006). Tanto os pés resfriados como os congelados analisados neste estudo apresentaram valores em conformidade com a legislação chinesa (Figura 1).



**Figura 1** Médias dos resultados encontrados na CPMM nas etapas do processamento e limites bacteriológicos permitidos pela legislação chinesa para carne de aves.

Os valores encontrados para coliformes totais e termotolerantes nos pés estudados apresentaram redução mais evidente conforme a etapa do processamento tecnológico. Foi observada uma redução entre P1 e P4 de  $5,62 \log_{10}$  para coliformes totais e de  $5,45 \log_{10}$  para coliformes termotolerantes, tendo havido diferença significativa entre P1 e as demais etapas. O mesmo ocorreu em relação aos coliformes totais entre P2 e P3 para P4 e, em relação aos coliformes termotolerantes, entre P3 e P4. Isso pode ter ocorrido pela menor resistência deste grupo de bactérias frente às modificações bruscas de temperatura durante o processamento, nas etapas de escaldagem (P2), pré-resfriamento (P3) e congelamento (P4). Galhardo et al. (2006) e Lopes et al. (2007) encontraram valores similares para NMP de coliformes totais e termotolerantes em carcaças de frango, quando comparadas às obtidas no presente trabalho. Outros pesquisadores ao

analisarem carcaças de frango quanto à contaminação por coliformes termotolerantes encontraram amostras em desacordo com a RDC nº 12, 2001 (BRASIL, 2001). Cardoso et al. (2005) obtiveram 6,9% (2/29) das amostras em desacordo com a legislação, enquanto Wurfel et al. (2009), no período entre 2003 e 2008, encontraram 11% (26/238). Todas as amostras estudadas no presente trabalho estavam em conformidade com o padrão nacional para coliformes termotolerantes em carnes resfriadas ou congeladas de frango (Figura 2) (BRASIL, 2001), o único existente no Brasil, já que não há uma legislação específica para pés de frangos de corte. Em relação aos padrões chineses apresentados por Bugang (2006), as amostras resfriadas apresentaram contaminação superior à permitida, porém as congeladas estavam em conformidade com a legislação (Figura 2). Os padrões chineses destacam-se por serem muito rigorosos para esta análise, uma vez que institui limite 100 vezes inferior ao padrão brasileiro e, por isso, pode ser considerado como uma barreira sanitária, pois é utilizado em padrão que se assemelha ao de produtos preparados para consumo, enquanto pés são produtos *in natura* (WHO, 2007).



**Figura 2** Médias dos resultados encontrados na NMP nas etapas do processamento e limites bacteriológicos permitidos pela legislação chinesa e brasileira para carne de aves.

Doyle e Schoeni (1987) relataram o isolamento de *E. coli* O157:H7, em carne de frango dos EUA, porém, nos trabalhos realizados no Brasil, não foi obtida positividade para essa bactéria em alimentos até o presente momento (DDTHA, 2010a). Nesse trabalho algumas amostras provenientes de dois lotes em P1 se mostraram positivas frente ao antissoro O157, que são pertencentes ao grupo EHEC e podem representar risco em saúde coletiva. Entretanto, como ocorreu em pesquisa realizada por Silva et al. (2003), nenhum isolado foi confirmado como do sorotipo O157:H7. Este estudo corrobora os resultados obtidos a partir da análise de outros alimentos por pesquisadores nacionais (SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2003; SILVEIRA et al., 1999).

Segundo USDA (1996) a resistência térmica de *E. coli* O157:H7 é ligeiramente menor que de *Salmonella* spp. e, portanto, os tratamentos térmicos que garantem a eliminação de *Salmonella* spp. também são capazes de eliminar *E. coli* O157:H7. Esta diferença na resistência a temperaturas elevadas foi verificada por Ahmed et al. (1995), Ahmed e Conner (1995), Juneja e Marmer (1999) e Kotrola et al. (1997).

Com exceção de um dos lotes positivos para *Salmonella*, em todos os outros foi isolada *Salmonella* Schwarzengrund. Este sorotipo foi o segundo mais prevalente em pesquisa realizada por Santos et al. (2000) e o mais prevalente por Boni (2007). Os dois outros sorotipos, Anatum e Corvallis, foram isolados a partir da amostra de um mesmo lote. Isto demonstra a possibilidade de contaminação por diferentes sorotipos na mesma amostra e a importância da sorotipificação de todas as colônias sugestivas, identificadas pelos testes bioquímicos e sorológicos.

Em relação à prevalência de *Salmonella* spp. nos lotes de frangos de corte estudados, foi obtido valor mais alto, correspondente a 68,42% (13/19), quando comparado a trabalhos realizados no Brasil por Vilela (2000), que obteve valor de 33,33% (9/27), enquanto Rocha et al. (2003), Oliveira (2004) e Cortez (2006) obtiveram valores de 55,56% (10/18), 14,29% (2/14) e 22,22% (8/36), respectivamente. Valores de prevalência semelhantes foram encontrados em plantéis de frangos de corte em países da União Europeia como Hungria com 65,7% (236/359) e Polônia com 57,7% (206/357) (EFSA, 2007b). Também foi semelhante à prevalência de *Salmonella* spp. em 55% dos pés de frango antes da escaldagem, obtida a partir do estudo feito por Kotula e Pandya (1995). Vale ressaltar que o índice de detecção da bactéria pode ter sido aumentado devido a metodologia

utilizada, já que a maioria dos testes utiliza 25 gramas do produto analisado em 225mL de SSP, enquanto no presente estudo os “pools” de pés foram rinsados em SSP.

Comparando valores encontrados a partir de pesquisas de *Salmonella* spp. entre produtos processados, pés congelados e carcaças de frango, o resultado obtido no trabalho para os pés após o congelamento (P4), 5,26% (1/19), foi igual ao encontrado por Oliveira (2004) em carcaças congeladas, 5,26% (1/19) e similar ao encontrado por Maldonado (2008) com 6,7% (2/30) das carcaças coletadas em feira, contaminadas pela bactéria. Muitos pesquisadores em levantamentos obtiveram resultados próximos ao encontrado neste trabalho. Dados referentes ao PREBAF, publicados pela ANVISA, apontam uma prevalência nacional da bactéria de 4% em carcaças comercializadas no varejo, similar à de 3,21%, encontrada em diversos produtos de origem avícola na Europa (ANVISA, 2008; EFSA, 2010). Outros trabalhos realizados em menor escala demonstram prevalência maior do patógeno em carcaças de frangos como 32,0% (48/150) por Santos et al. (2000), 19,8% por Rezende et al. (2005), 22,2% (8/33) encontrado por Cortez (2006), 39,3% (24/61) por Ribeiro (2007), 24,2% (8/33) por Maldonado (2008) e 9,6% (25/260) por Duarte et al. (2009).

Houve uma redução na prevalência de *Salmonella* spp. nos lotes estudados de 92,31%. Na análise dos microrganismos indicadores testados ocorreu redução de 99,98% (3,43 log<sub>10</sub>) em relação à CPMM e 99,99% (5,62 log<sub>10</sub> e 5,45 log<sub>10</sub>) em relação à CT e CTT, respectivamente. A partir destes resultados, observa-se que os microrganismos utilizados como indicadores não apresentam relação direta com a presença de patógenos em alimentos, como relatado por Banwart (1981b) e Morton (2001), entretanto a sua presença é um indicador de que houve contaminação por enterobactérias.

Neste trabalho houve isolamento de *Salmonella* spp. em pés processados (P4), submetidos a temperatura de escaldagem de 65°C. Juneja et al. (2001), Juneja et al. (2003), Mazzota (2000) e Murphy et al. (2000) estudaram resistência térmica de *Salmonella* spp., concordando que a temperatura em torno de 65°C não é suficiente para a eliminação dessas bactérias no tempo de 28 segundos, no qual ocorre a escaldagem dos pés. Segundo Juneja et al. (2001) e Mazzota (2000), 71°C seria uma temperatura suficiente para descontaminação de até 7 log<sub>10</sub> *Salmonella* spp. no tempo de processamento utilizado. Entretanto, Juneja et al. (2003) e Murphy

et al. (2000) demonstram que esta temperatura, no período de tempo utilizado no trabalho, não é suficiente para que esta quantidade de bactérias seja eliminada. Possivelmente os pés do presente estudo foram descontaminados ao longo do processamento por haver menor quantidade de *Salmonella* spp. e pelo processo adicional de remoção da cutícula do pé.

No Brasil não há exigências legais quanto ao uso de determinada temperatura na escaldagem de pés de frango, porém existem indicações descritas no RIISPOA (BRASIL, 1952). Uma das faixas de temperatura na escaldagem sugerida pelo RIISPOA é entre 80°C e 90°C, mas geralmente não é utilizada por questões de economia na utilização de vapor pela indústria. Considerando os padrões microbiológicos para carne de frango da China citados por Bugang (2006), que exigem ausência da bactéria em produtos avícolas, o lote em que foi encontrada bactérias do gênero *Salmonella* nos pés processados não estava em conformidade. Os EUA contestam os padrões chineses considerando-os muito rigorosos, sendo comparáveis ao nível de exigência para alimentos prontos para consumo, estabelecidos pelo Codex Alimentarius (WHO, 2007).

A partir dos resultados, novos estudos que caracterizem o processamento de pés de frango e definam padrões a serem seguidos poderão ser desenvolvidos posteriormente, assim como ocorreu com carcaças de frango. Devem ser testados diferentes tempos e temperaturas de escaldagem, com diferentes concentrações dos patógenos e contaminantes indicadores, bem como diferentes volumes de água e teores de cloro durante o pré-resfriamento, determinando o processamento adequado para que seja garantida a ausência de *Salmonella* spp. no produto. A partir daí, o processo de escaldagem poderá ser estabelecido como um Ponto Crítico de Controle.

Também será importante avaliar se há recontaminação por *Salmonella* spp. nos diferentes pontos do processamento após escaldagem. Pois se isso for evitado, poderá ser obtido um produto *in natura* com mesmo padrão higiênico-sanitário de produtos prontos para consumo, através de um processamento seguro e de baixo custo.

## 6 CONCLUSÕES

Ficou demonstrada a redução na contaminação de pés de frangos de corte após o processamento tecnológico.

As análises quantitativas dos pés de frangos de corte apresentaram valores inferiores aos estabelecidos pela legislação brasileira para contaminação microbiana em carne de frango, tanto nos pés resfriados como nos congelados estudados.

As análises quantitativas dos pés de frangos de corte apresentaram valores em acordo com a legislação chinesa para produtos congelados.

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Schwarzengrund foi detectada em 92,31% das amostras positivas para *Salmonella* dos pés de frango coletados no início do processamento.

O processamento tecnológico nos pés de frangos estudados eliminou 92,31% da contaminação por *Salmonella* spp., devendo ser implementadas ações para que essa redução possa alcançar 100%.

Não foi detectada a presença de *Escherichia coli* O157:H7 nos pés de frango estudados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF ver ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS.

AHMED N. M.; CONNER D. E. Evaluation of Various Media for Recovery of Thermally-injured Escherichia-coli O157:H7. *Journal of Food Protection*: v. 58, n. 4, p. 357-360, 1995.

AHMED N. M.; CONNER D. E.; HUFFMAN D. L. Heat-resistance of Escherichia coli O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. *Journal of Food Science*: v. 60, n. 3, p. 606-610, 1995.

ALVES, S. G. T.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de material colagenoso de pés de frango. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*: v. 52, n.3, p. 289-293. set. 2002.

ANDREATTI FILHO, R. L. Paratifo aviário. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. *Patologia Aviária*. Barueri: Manole, 2009. 510 p. cap. 3, p. 18-33.

ANDREATTI FILHO, R. L.; FERNANDES, S. A.; BORETTI, L. P.; BARROS, M. R.; DEL BEM, S. R.; FONTANA, A.; SAMPAIO, H. M.; SAVANO, E. N. Sorovares de Salmonella isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. *Revista de Educação Continuada CRMV-SP*: v. 4, n. 3, p. 90-101, 2001.

ANDREWS, W. H.; FLOWERS, R. S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J. S. *Salmonella*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Ann Arbor: Sheridan Books, 2001. 618 p. cap. 37, p. 357-380.

ANVISA ver BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.

APA ver ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE AVICULTURA

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS. *Exportação Mundial de Carne de Frango - Principais Países (2000 - 2007)*. Disponível em: < <http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoMundial/MercadoMundial.php>>. Acesso em: 20 maio 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS. *Exportações brasileiras de carne de frango*. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoExterno/Atual.php>>. Acesso em: 27 jan. 2010.

\_\_\_\_\_. *Relatório Anual 2008/2009*. Disponível em: <[http://www.abef.com.br/Relatorios\\_Anuais.php](http://www.abef.com.br/Relatorios_Anuais.php)>. Acesso em: 08 nov. 2009

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE AVICULTURA. *Destino das Exportações Brasileiras*. Disponível em: <<http://www.apa.com.br/estatisticas/destimpfrg.htm>>. Acesso em: 27 jan. 2010

ASTEN, A. J. A. M.; DIJK, J. E. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *Immunology and Medical Microbiology*: v. 44, P. 251-259, 2005.

BANWART, G. J. Estimating Number of Microorganisms. In: \_\_\_\_\_. *Basic Food Microbiology*. Westport: Eastern Graphics, 1981a. 773 p. cap. 2, p. 18-55.

\_\_\_\_\_. Indicator Organisms. In: \_\_\_\_\_. *Basic Food Microbiology*. Westport: Eastern Graphics, 1981b. 773 p. cap. 7, p. 389-409.

BEAN, C.; JACOBSON, J.; RYAN, S. Chicken Paw, Wing and Wing tip Exports to China 2007. *Global Agriculture Information Network*. Beijing: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – Foreign Agricultural Service. GAIN Report Number: CH7006, 07 fev. 2007.

BERCHIERI JR., A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. *Doenças das Aves*. 2 ed. Campinas: FACTA, 2009. 1104 p. cap. 4.1, p. 435-456.

BILGILI, S. F.; ZELENKA, D.; MARION, J. E. Microbiological quality of broiler chicken feet (paws). In: International Poultry Scientific Forum, 2003, Atlanta. *Abstracts...* Atlanta: Poultry Science Association, 2003. 55 p. v. 82, p. 21.

BILGILI, S.F. Microbiological quality of broiler chicken feet (paws) work. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por: <[felipefaccini@hotmail.com](mailto:felipefaccini@hotmail.com)> em 24 jan. 2010.

BONI, H. F. K. *Ocorrência de Salmonella spp. na cadeia avícola da região central do Mato Grosso do Sul*. Campo Grande, 2007. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2007.

BOONMAR, S.; BANGTRAKULNONT, A.; PORNRUNANGWONG, S.; MARNRIM, N.; KANEKO, K.; OGAWA, M. Predominant serovars of *Salmonella* in humans and foods from Thailand. *Journal of Medical Veterinary Science*: v. 60, n. 7, p. 877-880, 1998.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p.10.785, 07 jul. 1952. Seção 1.

\_\_\_\_\_. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de Salmonella sp. em Carcaças de Frangos e Perus. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 9, 10 de outubro de 2003a. Seção 1.

\_\_\_\_\_. Instrução Normativa Nº 62, DE 26 DE AGOSTO DE 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 14, 18 set. 2003b. Seção 1.

\_\_\_\_\_. *Intercâmbio Comercial do Agronegócio: principais mercados de destino*. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 469 p.

\_\_\_\_\_. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 226, 26 nov. 1998. Seção 1.

\_\_\_\_\_. Resolução nº 1, de 09 de janeiro de 2003. Aprova a uniformização da nomenclatura de produtos cárneos não formulados em uso para aves e coelhos, suídeos, caprinos, ovinos, bubalinos, eqüídeos, ovos e outras espécies de animais. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 2, 10 jan. 2003c. Seção 1.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 10 jan. 2001a.

\_\_\_\_\_. RDC nº 13, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carne de Aves e Seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 02 jan. 2001b.

\_\_\_\_\_. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF. *Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil*. Brasília: 2008. 186 p.  
BUGANG, W. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. FAIRS Product Specific - Fresh and Frozen Poultry Product Standard. *Global Agriculture Information Network*. Beijing: Foreign Agricultural Service. GAIN Report Number: CH6001, 17 jan. 2006.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 720 p. cap. 43, p. 319-328.

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

CDC ver CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food -- 10 States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. v. 58, n. 13, p. 333-337, abr. 2009.

\_\_\_\_\_. *Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2006*. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm>>. Acesso em: 24 jan. 2010.

\_\_\_\_\_. *Salmonellosis*. Apresenta informações gerais e técnicas sobre doenças de interesse em Saúde Pública. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 18 dez. 2008.

CHAO G.; ZHOU, X.; JIAO, X.; QIAN, X.; XU, L. Prevalence and antimicrobial resistance of foodborne pathogens isolated from food products in China. *Foodborne Pathog Dis*: v. 4, n. 3, p. 277-284, 2007.

CORTEZ, A. L. L. *Disseminação de bactérias dos gêneros Campylobacter e Salmonella em linhas de abate de aves*. Jaboticabal, 2006. 80 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006.

COSTA G. A.; HOFER, E. *Isolamento e Identificação de Enterobactérias*. Rio de Janeiro, 1972. 120 p. Monografia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1972.

DAHAL, N. *Prevalence and Antimicrobial Resistance of Salmonella in Imported Chicken Carcasses in Bhutan*. Berlin e Bhutan, 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública Veterinária) – Faculty of Veterinary Medicine - Freie Universität, Berlin e Veterinary Public Health Centre for Asia Pacific - Chiang Mai University, Buthan. 2007.

DDTHA ver DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR.

DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR. *Salmonella Enteritidis*: perguntas e respostas. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES/SP). Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/salmonella\\_pergresp.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/salmonella_pergresp.htm)>. Acesso em: 03 dez. 2008.

\_\_\_\_\_. *Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos e Água: Escherichia coli O157:H7 - enterohemorrágica (EHEC)*. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES/SP).

Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Ecolinet.htm>>. Acesso em: 18 jan. 2010a.

DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR. *SHU: Casos Notificados ao CVE ou rastreados e Coeficientes de Incidência, Estado de São Paulo, 1998 a 2007*. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES/SP). Disponível em: <[www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/IFNET9807\\_SHU.xls](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/IFNET9807_SHU.xls)>. Acesso em: 18 jan. 2010b.

DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Internacional Journal of Food Microbiology*. v. 12, p. 289-302, 1991.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Retail Fresh Meats and Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 53, n. 10, p. 2394-2396, oct. 1987.

DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D.; ANDRADE, P. L. A.; FALCÃO, L. S. P. C. A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 40, n. 3, p. 569-573, 2009.

ECDC ver EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.

EDUARDO, M. B. P.; MELLO, M. L. R.; KATSUYA, E. M.; MORAES, I. R.; FERNANDES, S. A.; GUAMIERI, C. E. *Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos e Água: Salmonella Enteritidis / Salmoneloses*. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) - Centro de Vigilância Sanitária (CVS) - Instituto Adolfo Lutz (IAL) - Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER). Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF\\_59Sen.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_59Sen.htm)>. Acesso em: 03 dez. 2008.

EFSA ver EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. *Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2009*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2009. 221 p.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*, Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *The EFSA Journal*: v. 98, p. 1-85, 2007a.

\_\_\_\_\_. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings of broiler flocks of *Gallus gallus*, Part B: factors related to *Salmonella* flock prevalence, distribution of *Salmonella* serovars, and antimicrobial resistance patterns. *The EFSA Journal*: v. 101, p. 1-86, 2007b.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. *The EFSA Journal*: v. 97, p. 1-84, 2007c.

\_\_\_\_\_. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal*: jan. 2010. 288 p. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1496.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

EUZÉBY, J. P. Society for Systematic and Veterinary Bacteriology. *Salmonella nomenclature*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/salmonellanom.html>>. Acesso em: 04 dez. 2008.

\_\_\_\_\_. Validation List no. 102 - Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: v. 55, p. 547-549, 2005.

FDA ver FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.

FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C. R.; DIAS, A. M. G.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; MELO, L. C. V. Salmonella serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*: v. 48, n. 4, p. 179-184, ago. 2006.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. *Doenças das Aves*. 2 ed. Campinas: FACTA, 2009. 1104 p. cap. 4.2, p. 457-468.

FIELDS, P. *Salmonella* Serotyping. In: ANNUAL PULSENET UPDATE MEETING, 10, 2006, Miami. *Apresentação em slide...* Disponível em: <<http://www.aphl.org/profdev/conferences/proceedings/Pages/10thAnnualPulseNetUpdateMeeting.aspx>>. Acesso em: 18 dez. 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Black Bug Book: Salmonella* spp. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/ucm069966.htm>>. Acesso em: 17 jan. 2010a.

\_\_\_\_\_. *Black Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Escherichia coli O157:H7*. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodborneillness/FoodborneillnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm071284.htm>>. Acesso em: 22 jan. 2010b.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. *Lethality and Stabilization Performance Standards for Certain Meat and Poultry Products*: Technical Paper. Washington: dez. 1998. Disponível em: <[http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/95-033F/95-033F\\_tech%20paper.pdf](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/95-033F/95-033F_tech%20paper.pdf)>. Acesso em: 22/01/2010.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Performance Standards for the Production of Certain Meat and Poultry Products. *Federal Register*. 96-10796, v. 61, n. 86, maio 1996.

\_\_\_\_\_. *Time-Temperature Tables for Cooking Ready-to-Eat Poultry Products*. Disponível em: <[http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISNotices/RTE\\_Poultry\\_Tables.pdf](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISNotices/RTE_Poultry_Tables.pdf)>. Acesso em: 22/01/2010a.

\_\_\_\_\_. *Microbiological Results of Raw Ground Beef Products Analyzed for Escherichia coli O157:H7, Summarized by Calendar Year*. Disponível em: <[http://www.fsis.usda.gov/Science/Ecoli\\_O157\\_Summary\\_Tables/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Science/Ecoli_O157_Summary_Tables/index.asp)>. Acesso em: 19 jan. 2010b.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: \_\_\_\_\_. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. 182 p. cap. 3, p. 54-60.

FROUFE, C. Brasil fecha primeira venda de frango à China. *Agência Estado*, 29 maio 2009. Disponível em: <<http://economia.estadao.com.br>>. Acesso em: 29 jan. 2010

FSIS ver FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE.

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

LOPES, M.; GALHARDO, J. A.; OLIVEIRA, J. T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S. F.; MULLER, E. E. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. *Semina*: v. 28, n. 3, p. 465-476, jul./set. 2007.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. Paris: World Health Organization e Institut Pasteur. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9. Ed, 2007.

HARRIGAN, W. F. General Viable Counts. In: \_\_\_\_\_. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1998. 532 p. cap. 18, p. 160-162.

HOFER, E., SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de Sorovares de *Salmonella* Isolados de Aves no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*: v. 17, n. 2, p. 55-62, abr./jun. 1997.

HUMPHREY, T. J. *Salmonella*, stress, responses and food safety. *Nature Reviews Microbiology*: v. 2, n. 6, p. 504-509, jun. 2004.

IWAI, K.; HASEGAWA, T.; TAGUCHI, Y.; MORIMATSU, F.; SATO, K.; NAKAMURA, Y.; HIGASHI, A.; KIDO, Y.; NAKABO, Y.; OHTSUKI, K. Identification of Food-Derived Collagen Peptides in Human Blood after Oral Ingestion of Gelatin Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: v. 53, n. 16, p. 6531–6536, ago. 2005.

JANDU, N.; HO, N. K. L.; DONATO, K. A.; KARMALI, M. A.; MASCARENHAS, M.; DUFFY, S. P.; TAILOR, C.; SHERMAN, P. M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Gene Expression Profiling in Response to Growth in the Presence of Host Epithelia. *PLoS ONE*: v. 4, n. 3, e4889, mar. 2009.

JUNEJA, V. K.; EBLEN, B. S.; MARKS H. M. Modeling non-linear survival curves to calculate thermal inactivation of *Salmonella* in poultry of different fat levels. *International Journal of Food Microbiology*: v. 70, n. 1-2, p. 37-51, 2001.

JUNEJA, V. K.; MARKS, H. M.; MOHR, T. Predictive Thermal Inactivation Model for Effects of Temperature, Sodium Lactate, NaCl, and Sodium Pyrophosphate on *Salmonella* Serotypes in Ground Beef. *Applied and Environmental Microbiology*: v. 69, n. 9, p. 5138–5156, set. 2003.

JUNEJA, V. K.; MARMER, B. S. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D- and z-value determinations in turkey, lamb and pork. *Food Research International*: v. 32, n. 1, p. 23-28, jan. 1999.

KARMALI, M. A.; STEELE, B.T.; PETRIC, B.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *The Lancet*: v. 1, p. 619-620, mar. 1983.

KIM, C. R. Microbiological Evaluation on Chicken Carcasses During a Commercial Chicken Processing and Storage. *Journal of Food Hygiene and Safety*: v. 13, n. 3, p. 238-242, mar. 1998.

KISS, T.; MORGAN, E.; NAGY, G.. Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Microbiology Letters*: v. 275, p. 153-159, ago. 2007.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: ITO, K. F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Ann Arbor: Sheridan Books, 2001. 532 p. cap. 8, p. 69-82.

KOTROLA, J. S.; CONNER, D. E.; MIKEL, W. B. Thermal Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Cooked Turkey Products. *Journal of Food Science*: v. 62, n. 4, p. 875-877, 1997.

KOTULA, K. L.; PANDYA, Y. Bacterial Contamination of Broiler Chickens Before Scalding. *Journal of Food Protection*: v. 58, p. 1326-1329, dez. 1995.

LAMMERDING, A. M.; FAZIL, A. M.; PAOLI, G. M. *Microbial Food Safety Risk Assessment*. In: ITO, K. F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Ann Arbor: Sheridan Books, 2001. 532 p. cap. 29, p. 267-281.

LANDGRAF, M. Microrganismos Indicadores. In: \_\_\_\_\_. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. 182 p. cap. 3, p. 27-31.

LE MINOR, L.; POPOFF, M.Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., norn. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Bacteriology*: v. 37, n. 4, p. 465-468, out. 1987.

LIU, D. C.; LIN, Y. K.; CHEN, M. T. Optimum Condition of Extracting Collagen from Chicken Feet and its Characteristics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*: v.14, n.11, 2001.

LODDI, M. M., GONZALES, E., TAKITA, T. S., MENDES, A. A., ROÇA, R. O. Uso de Probiótico e Antibiótico sobre o Desempenho, o Rendimento e a Qualidade de Carcaça de Frangos de Corte. *Revista brasileira de zootecnia*: v. 29, n. 4, p. 1124-1131, 2000.

MALDONADO, A. G. *Ocorrência de Salmonella spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR*. São Paulo, 2008. 74 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

MAROSO, M. T. D. Efeito da redução de temperatura de carcaças de frango na multiplicação de microrganismos. Porto Alegre, 2008. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2008.

MAZZOTTA, A. S. D- and Z-values of *Salmonella* in ground chicken breast meat. *Journal of Food Safety*: v. 20, p. 217-223., out. 2000.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V. M.; LINDA, F.; BREESE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. - CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Food-Related Illness and Death in the United States*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no5/mead.htm>>. Acesso em: 08 nov. 2009.

ROCHA, P. T.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LOULY, P. R.; NASCIMENTO, M. N. *Salmonella* spp. em forros de caixas de transporte e órgãos de pintos de um dia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*: v. 55, n. 6, p. 672-676, 2003.

MORTON, R. D. Aerobic Plate Count. In: ITO, K. F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Ann Arbor: Sheridan Books, 2001. 532 p. cap. 7, p. 63-67.

MURPHY, R. Y.; MARKS, B. P.; JOHNSON, E. R.; JOHNSON, M.G. Thermal Inactivation Kinetics of *Salmonella* and *Listeria* in Ground Chicken Breast Meat and Liquid Medium. *Journal of Food Science*: v. 65, n. 4, p. 706-710, 2000.

MURUKMAR, H. V.; RAHMAN, H.; KUMAR, A.; BHATTACHARYYA, D. Isolation, phage typing & antibiogram of *Salmonella* from man & animals in northeastern India. *Indian Journal of Medical Research*: v. 122, p. 237-242, set. 2005.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*: v. 11, n. 1, p. 142-201, jan. 1998.

OLIVEIRA, W. F. *Isolamento e tipificação de Salmonella da cadeia produtiva de frango de corte da região metropolitana de Fortaleza-CE*. Fortaleza, 2004. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2004.

ORDOÑEZ, J. G.; TRABULSI, L. R. *Escherichia coli* Enteroemorrágica (EHEC). In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 720 p. cap. 37, p. 285-288.

RAGHUBEER, E. V.; MATCHES, J. R. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. *Journal of Clinical Microbiology*: v. 28, n. 4, p. 803-805, abr. 1990.

REEVES, M.W.; EVINS, G.M.; HEIBA, A. A.; PLIKAYTIS, B.D.; FARMER III, J.J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology*: v. 27, n. 2, p. 313-320, fev. 1989.

REZENDE, C. S. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LINHARES, G. F. C.; MESQUITA, A. Q.; MINAFRA, C. S. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no estado de Goiás, e perfil de resistência a antimicrobianos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*: v.100, n. 555-556, p.199-203, 2005.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*: v. 38, p. 296-299, 2007.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine*: v. 308, n. 12, p. 681-685, mar. 1983.

RODRIGUES, F. S. *Estratégias mercadológicas da cadeia agroexportadora de frango de corte no Brasil*. Campo Grande, 2008. 170 p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – Departamento de Economia e Administração, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2008.

SAIGA, A.; IWAI, K.; HAYAKAWA, T.; TAKAHATA, Y.; KITAMURA, S.; NISHIMURA, T.; MORIMATSU, F. Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Peptides Obtained from Chicken Collagen Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: v. 56, n. 20, p. 9586–9591, out. 2008.

SANTOS, A. L.; SAKOMURA, N. K.; FREITAS, E. R.; FORTES, C. M. L. S.; CARRILHO, E. N. V. M.; FERNANDES, J. B. K. Estudo do Crescimento, Desempenho, Rendimento de Carcaça e Qualidade de Carne de Três Linhagens de Frango de Corte. *Revista brasileira de zootecnia*: v. 3, n. 4, p. 1589-1598, 2005.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A. Salmonella em carcaças de frango congeladas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*: v. 20, n. 1, p. 39-42, jan./mar. 2000.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEIL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*: v. 70, n. 5, p. 2959-2965, maio 2004.

SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; CONTRERAS, C.; BERAQUET, N. J.; YOKOYA, F.; NASCIMENTO, C. A.; OLIVEIRA, V. M.; TSE, C. L. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*: v. 21, n. 2, p. 223-227, mai./ago. 2001.

SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M. M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*: v. 23, n. 2, p. 167-173, 2003.

SILVEIRA, N. F. A.; SILVA, N.; CONTRERAS, C.; MIYAGUSKU, L.; BACCIN, M. L. F.; KOONO, E.; BERAQUET, N. J. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers produced in Brasil. *Journal Food Protection*: v. 62, n. 11, p. 1333-1335, 1999.

SWANSON, K. M. J.; PETRAN, R. L.; HANLIN, J. H. Culture Methods for Enumeration of Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Ann Arbor: Sheridan Books, 2001. 618 p. cap. 6, p. 53-62.

TALAMINI, D. J. D.; MARTINS, F. M.; NOVAES, M. Produção e Mercado Nacional e Internacional do Frango. *Embrapa Suínos e Aves*. Concórdia: 2005. Disponível em: <[www.cnpas.embrapa.br/sgc/sgc\\_artigos/artigos\\_v8d34i1j.pdf](http://www.cnpas.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_v8d34i1j.pdf)>. Acesso em: 25 jan. 2010.

TEIXEIRA, V. Q. *Anatomopatologia e bacteriologia da pododermatite em frangos de corte sob Inspeção Sanitária*. Niterói: 2008. 51 p.. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. 2008.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z.; LUCIANO, R. L.; CASTRO, A. G. M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*: v. 38, n.9, p. 2557-2560, dez. 2008.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZÉBY, J. P. Taxonomic Note - Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: v. 55, p. 521–524, 2005.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. *Enterobacteriaceae*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 720 p. cap. 35, p. 269-276.

TROLLER, J. A. *Salmonella* and *Shigella*. In: DEFIGUEIREDO, M. P.; SPLITTSTOESSER, D. F. *Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects*. Westport: Avi Publishing Company, 1976. 492 p. cap. 3, p. 129-155.

TURRA, F. S. *Apresentação do balanço exportações 2009*. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoExterno/Atual.php>>. Acesso em: 27 jan. 2010

UBA ver UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA.

UNECE ver UNITED NATIONS ECONOMIC COMMISSION FOR EUROPE.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. *Relatório Anual 2008*. Disponível em: <[http://www.uba.org.br/site3/relatorios\\_anuais.php#>](http://www.uba.org.br/site3/relatorios_anuais.php#>). Acesso em: 08 nov. 2009

UNITED NATIONS ECONOMIC COMMISSION FOR EUROPE. *Standard for Chicken Meat: Carcasses and Parts*. 2006 Ed. Genova: United Nations Publications, 2007. 58 p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Internacional Egg and Poultry Review*. Iwoa: Agricultural Marketing Service. v. 12, n. 19. 12 mai. 2009.

USDA ver UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.

VILELA, V. O. *Salmonelas em frangos de corte: caracterização antigênica e perfil de resistência frente aos antimicrobianos*. Rio de Janeiro: 2000. 102 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2000.

WATANABE-KAMIYAMA, M.; SHIMIZU, M.; KAMIYAMA, S.; TAGUCHI, Y.; SONE H.; MORIMATSU, F.; SHIRAKAWA, H.; FURUKAWA, Y.; KOMAI, M. Absorption and Effectiveness of Orally Administered Low Molecular Weight Collagen Hydrolysate in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: v. 58, n. 2, p. 835–841, 2010

WHO ver WORLD HEALTH ORGANIZATION

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Questions from the United States to China concerning Sanitary and Phytosanitary Measures*. Genova: Committee on Sanitary and Phytosanitary Measures, G/SPS/W/213, out. 2007.

WÜRFEL, S. F. R.; CAMACHO, N. N.; ROSA, J. V.; PRATES, D. F.; COLVARA, J. G.; LIMA, A. S.; SILVA, W. P. Avaliação Microbiológica de Carcaças de Frango Comercializadas na Região de Pelotas/RS, no Período de 2003 a 2008. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. *Anais eletrônicos...* Porto Alegre: SOVERGS, 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/trabalhos.htm>>. Acesso em: 17 maio 2009.

YEUNG, S. T. K., KAM, K. M. *Salmonella* Surveillance in Hong Kong. *Public Health & Epidemiology Bulletin*. Hong Kong: Department of Health Hong Kong. v. 10, n. 6, dez. 2001.

ZHANG, J. Semi-Annual Report 2009. *Global Agriculture Information Network*. Beijing: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – Foreign Agricultural Service. GAIN Report Number: CH9014, 05 mar. 2009.