

FLÁVIO BARBOSA DA SILVA

**PESQUISA DE *Salmonella* spp E *Escherichia coli* EM
CORTES DE FRANGO TEMPERADO
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE RIO VERDE,
GOIÁS**

Jataí - GO

2018



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

1. Identificação da Tese ou Dissertação: Pesquisa de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* em cortes de frango temperado comercializados no município de Rio Verde, Goiás.

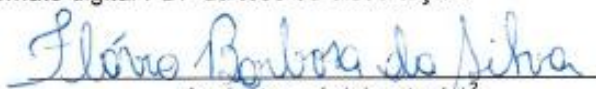
Nome completo do autor: Flávio Barbosa da Silva

Título do trabalho: Pesquisa de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* em cortes de frango temperado comercializados no município de Rio Verde, Goiás.

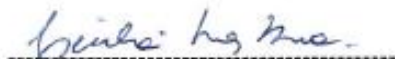
1. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 17 / 12 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada. Versão atualizada em setembro de 2017.

FLÁVIO BARBOSA DA SILVA

ORIENTADORA: PROFa DRa CECÍLIA NUNES MOREIRA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. IDERVAL DA SILVA JÚNIOR SOBRINHO

**PESQUISA DE *Salmonella* spp E *Escherichia coli* EM
CORTES DE FRANGO TEMPERADO
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE RIO VERDE,
GOIÁS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal de
Goiás, Regional Jataí, como pré-requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Biociência Animal.

Jataí - GO

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

BARBOSA DA SILVA, FLÁVIO;
PESQUISA DE SALMONELLA SPP E ESCHERICHIA COLI EM
CORTES DE FRANGO TEMPERADO COMERCIALIZADOS NO
MUNICÍPIO DE RIO VERDE, GOIÁS [manuscrito] / FLÁVIO; BARBOSA
DA SILVA. - 2018. xi, 50 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. DRª CECÍLIA; NUNES MOREIRA; co orientador Dr. DR
IDERVAL DA; SILVA JÚNIOR SOBRINHO.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Biociência, Programa de Pós-Graduação em Biociência
Animal, Jataí, 2018.

Bibliografia.

Inclui fotografias, gráfico, tabelas.

1. Saúde Pública. 2. Segurança Alimentar. 3. Vigilância em Saúde. I. NUNES
MOREIRA, DRª CECÍLIA; , orient. II. Título.

CDU 639.09

Universidade Federal de Goiás Regional Jataí

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Ata de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado

Aos trinta e um dias do mês de Outubro de 2018, às 13:30 horas, no Prédio da Pós-Graduação da Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, iniciaram-se os trabalhos referentes à Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do candidato **FLÁVIO BARBOSA DA SILVA**, com o trabalho intitulado " **PESQUISA DE *Salmonella spp* e *Escherichia coli* EM CORTES DE FRANGO TEMPERADO COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE RIO VERDE, GOIÁS**". A Banca Examinadora, constituída pelos(as) membros: Prof.^a Dr.^a Cecília Nunes Moreira (Orientadora), Prof.^a Dr.^a Cintia Silva Minafra Rezende (Membro Externo), Prof.^a Dr.^a Christiane Ricaldoni Giviziez (Membro Interno), Prof. Dr. Iderval da Silva Júnior Sobrinho (Membro Interno), considerou o candidato, Flávio Barbosa Silva: APROVADO (X) REPROVADO ().

Foi concedido um prazo de **60** dias, para o candidato efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora e entregar o trabalho em sua redação definitiva. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca.



Prof.ª Dr.ª Cecília Nunes Moreira Orientadora/Presidente



Prof.ª Dr.ª Christiane Ricaldoni Giviziez

Membro Interno



Prof.ª Dr.ª Cintia Silva Minafra Rezende

Membro Externo



Prof. Dr. Iderval da Silva Júnior Sobrinho

Membro Interno

Dedico esse trabalho a toda comunidade científica brasileira, os quais enfrentando a atual situação da ciência no país, ainda encontra animo e disposição para se lançar ao incrível mundo do conhecimento. Até aqui o “jeitinho” brasileiro tem nos surpreendido, mas desejamos que as próximas gerações encontrem um cenário mais favorável, promovendo a todos a fascinante emoção da descoberta.

Agradeço à Deus, pela sua infinita bondade e grandiosa providencia na minha vida durante esse processo formativo. A minha família base dos meus princípios e porto seguro onde encontro refúgio nos momentos difíceis. Agradeço ao apoio de todos os meus amigos, os quais me entendem e sempre me motivam a continuar, saibam que muitas vezes só persisto no caminho pois vocês me impulsionam a sempre caminhar. Aos colegas de mestrado e toda comunidade da UFG Regional Jataí, agradeço por permitirem fazer dessa instituição também a minha casa, em especial aos colegas de laboratório, pelas inúmeras horas de trabalho, fracassos, mas também vitórias, sem vocês esse trabalho não seria completo. Aos mestres que contribuíram direta ou indiretamente para meu crescimento acadêmico, em especial minha querida e generosa orientadora Prof.^a Dr^a Cecília Nunes Moreira, que mesmo sem me conhecer apostou em minhas ideias e hoje colhemos o fruto de nossos esforços. Ao meu co-orientador Prof. Dr^o Iderval Junior Sobrinho que me faz enxergar que nada está perdido quando se trata de ciência, obrigado pelas marcas deixadas em minha vida. E no mais agradeço pela atuação brilhante e eficaz do cartão de crédito de minha orientadora, como você foi útil para esse trabalho a você muito obrigado.

“Em todo jovem mesmo no mais infeliz, há um ponto acessível ao bem e a primeira obrigação do educador é buscar esse ponto, essa corda sensível do coração, e tirar bom proveito”
Dom Bosco

PESQUISA DE *Salmonella* spp E *Escherichia coli* EM CORTES DE FRANGO TEMPERADO COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE RIO VERDE, GOIÁS

Resumo

A alimentação tem sido motivo constante de preocupação mundial. Com a produção em larga escala a contaminação dos alimentos tem seu início na obtenção da matéria prima, pois durante a manipulação pode ocorrer uma série de fatores relacionados à falta de higiene dos equipamentos e até mesmo de quem os manipula. A contaminação pode se estender até as etapas de armazenamento, acondicionamento e distribuição, pois permitem a exposição direta ao ambiente. A carne de frango pode veicular patógenos já que sua base proteica é naturalmente nutritiva para os microrganismos. Os agentes biológicos mais comumente citados nos casos de Doenças Veiculadas por Alimentos são bactérias, vírus, toxinas, parasitas e substâncias tóxicas. Sendo as bactérias os agentes com maior relação dos casos e dentre elas a *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. A importância da vigilância alimentar, bem como seu impacto na saúde pública, torna necessário, a identificação da real qualidade microbiológica da carne de frango em especial quando comercializado na forma temperada, visto a escassez de trabalhos abordando esse tipo de matriz analítica, uma vez que essa, pode ser veiculadora de importantes patógenos, devido à grande preferência por parte dos consumidores para esse tipo de proteína processada. Assim propomos com esse trabalho, avaliar a carne de frango temperado comercializada no município de Rio Verde, Goiás, utilizando como agentes indicadores a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., visando identificar de sorotipos de importância para a saúde pública através da aplicação de técnicas moleculares, bem como seus fatores de risco e possíveis resistências aos antibióticos.

Palavras-chave: saúde pública, segurança de alimentos, vigilância em saúde.

RESEARCH OF *Salmonella* spp AND *Escherichia coli* IN COURTS OF CHICKEN MARKETED IN THE MUNICIPALITY OF RIO VERDE, GOIÁS

Abstrac

Food has been a constant cause of worldwide concern. With the large-scale production, contamination of food has its beginning in obtaining the raw material, because during the manipulation can occur a series of factors related to the lack of hygiene of the equipment and even of who manipulates them. Contamination can extend to the storage, packaging and distribution stages as they allow direct exposure to the environment. Chicken meat can transport pathogens since its protein base is naturally nutritious for microorganisms. The biological agents most commonly cited in cases of foodborne diseases are bacteria, viruses, toxins, parasites and toxic substances. Bacteria are the agents with the highest ratio of cases and among them *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. The importance of food surveillance, as well as its impact on public health, makes it necessary to identify the actual microbiological quality of poultry meat especially when marketed in the temperate form, given the scarcity of studies addressing this type of analytical matrix, since this can be a carrier of important pathogens, due to the high preference of consumers for this type of processed protein. Thus, we propose to evaluate the meat of temperate chicken commercialized in the city of Rio Verde, Goiás, using as indicator agents *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., In order to identify serotypes of importance for public health through the application of molecular techniques, as well as its risk factors and possible resistance to antibiotics.

Key words: public health, food safety, health surveillance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	
2 CAPÍTULO 1 - ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE RIO VERDE, GOIÁS.....	05
2.1 Material e Métodos.....	08
2.2 Resultados e Discussão.....	09
2.3 Conclusões.....	14
Referências.....	15
3 CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE SORAVARES PATOGENICOS DE <i>SALMONELLA</i> spp. EM CORTES DE FRANGO TEMPERADO COMERCIALIZADOS NO MUNICIPIO DE RIO VERDE, GOIÁS.....	18
3.1 Material e Métodos.....	21
3.2 Resultados e Discussão.....	23
3.3 Conclusões.....	30
Referências.....	31
4 CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PATOTIPOS DE <i>Escherichia coli</i> DIARREIOGÊNICAS EM CARNES DE FRANGO TEMPERADO COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE RIO VERDE, GOIÁS.....	34
	34
4.1 Material e Métodos.....	36
4.2 Resultados e Discussão.....	38
4.3 Conclusões.....	45
Referências.....	46
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
ANEXO.....	50

1.INTRODUÇÃO GERAL

Por definição proposta pela Organização Mundial da Saúde, Doença Veiculada por Alimento (DVA) é toda e qualquer enfermidade causada pela ingestão de alimentos ou água contaminados podendo essa ser de origem infecciosa, quando provocadas por microrganismos, ou tóxica, quando provocadas por toxinas químicas (WHO 2002).

A alimentação tem sido motivo constante de preocupação mundial. Inúmeras são as causas que geram a contaminação dos produtos alimentícios. Desta forma, a Organização Mundial de Saúde tem se empenhado na redução da contaminação de alimentos por agentes biológicos, considerados patogênicos por causarem danos à saúde (JOOB & WIWANITKIT, 2015).

Com a produção em larga escala a contaminação dos alimentos pode ter seu início na produção da própria matéria prima. Durante a manipulação pode ocorrer uma série de fatores relacionados à falta de higiene dos equipamentos e até mesmo de quem os manipula. A contaminação pode se estender até as etapas de armazenamento, acondicionamento e distribuição, pois estes permitem a exposição direta ao ambiente (PEREIRA, 2016).

A carne de frango pode veicular patógenos já que sua base proteica é naturalmente nutritiva para os microrganismos. Eles e se proliferam-se devido a fatores extrínsecos como a contaminação durante o abate e fatores intrínsecos como o pH favorável. São inúmeras as possibilidades de contaminar o alimento por bactérias patogênicas e o abate é um dos pontos cruciais (BISCOLA et al., 2011; CHOI et al., 2013; VELHO et al., 2015).

Os agentes biológicos comumente envolvidos nos casos de DVA,S são bactérias, vírus, toxinas, parasitas e substâncias tóxicas. Sendo as bactérias os agentes mais citados, e dentre elas as mais comuns são *Salmonella* spp., e *Escherichia coli* (BRASIL, 2014).

O controle e monitoramento de *Salmonella* spp. em carne de frangos e perus é realizado no Brasil desde 2003, conforme Instrução Normativa nº 70, de 6 de outubro de 2003, a qual foi recentemente atualizada por meio da Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016, trazendo grandes avanços para o controle de salmonela em aves. A nova instrução normativa prevê medidas a serem adotadas em toda a

cadeia produtiva, desde as granjas até o abatedouro frigorífico, visando reduzir a prevalência deste patógeno e contribuir para proteção da saúde dos consumidores (BRASIL, 2018).

Salmonella spp. possuem forma de bastonete, são Gram negativas e pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são responsáveis por causar doenças nos animais e nos seres humanos, encontrada primeiramente no trato intestinal de animais (DAMER, 2014).

Escherichia coli constitui um grupo de bactérias Gram negativas clássicas que normalmente habitam a microbiota intestinal do homem e de animais, sendo tipicamente não patogênicas. Entretanto, subgrupos de *E. coli* apresentam fatores de virulência que as tornam capazes de causar doenças. É um indicador de contaminação fecal, por estar na microbiota das aves e outros animais. Logo, falhas no abate e manipulação podem contaminar os alimentos durante todo o processamento até a mesa do consumidor (CALDORIN, 2013; TRUNG et al., 2016).

A importância da vigilância alimentar, bem como seu impacto na saúde pública, torna necessária, a identificação da real qualidade microbiológica da carne de frango, uma vez que essa, pode ser veiculadora de importantes patógenos. Ao avaliar a presença de microrganismos em alimentos, não se deve negligenciar o aspecto da suscetibilidade a antibióticos, os quais são utilizados na produção de animais destinados ao consumo humano, em que se observa o uso de forma indiscriminada.

Entre os fatores que contribuem para esse uso irracional destacam-se, as dúvidas no diagnóstico entre infecções bacterianas e virais; ausência de programas de uso racional de antimicrobianos; erros na prescrição quanto à sua administração e o não cumprimento do período de carência, tem contribuído para o desenvolvimento de resistência microbiana (MOTA et al. 2005; MARQUES et al., 2008; NOVARETTI, 2014).

Assim, propomos com esse trabalho, avaliar a carne de frango temperado comercializada no município de Rio Verde, Goiás, utilizando como agentes indicadores a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, visando identificar os genovares de importância para a saúde pública através da aplicação de técnicas moleculares, bem como seus fatores de risco e possível resistência aos antibióticos.

REFERÊNCIAS

- BISCOLA, N.P.; FORNAZARI, F.; SAAD, E.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; CAMPAGNER, M.V.; LANGONI, H.; BARRAVIERA, B; FERREIRA JUNIOR. Serological investigation and PCR in detection of pathogenic leptospires in snakes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Botucatu, v.31, n.9, p.806-811, 2011.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 216/2014**: Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde. Diário oficial da união, 18 nov, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 70**, 10 de outubro de 2003. Dispõe sobre os Programa de redução de patógenos- monitoramento microbiológico - controle de Salmonella sp. em carcaças de frangos e perus. Diário Oficial da União, Brasília, 10 out. 2003 Seção 1, p. 9.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica Salmonella CRISC, Brasília, 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/entenda-melhor-salmonela-em-carne-de-frango.pdf>>Acesso em: 19 jun 2018.
- CALDORIN M, ALMEIDA I.A.Z.C., PERESI JTM, ALVES EC. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. Bol Epidemiol Paul, v.10, n. 110, p.4-20, 2013.
- CHOI, Y. M.; PARK, H. J.; JANG, H. I.; KIM, S. A.; IMM, J. Y.; HWANG, I. G.; RHEE, M. S. Changes in microbial contamination levels of porcine carcasses and fresh pork in slaughterhouses, processing lines, retail outlets, and local markets by commercial distribution. **Veterinary Science**. South Korea, v.94, n.3, p.413-418, 2013.
- DAMER, J.R.S; et al. Contaminação de Carne Bovina Moída Por *Escherichia coli* e *Salmonella Spp*. **Revista contexto & saúde**. v. 14 n. 26 p. 20-27. 2014.
- JOOB, B.; WIWANITKIT, V. Food poisoning outbreak in Thailand: A review on situations. **Asian Pacific Journal of Tropical Diseases**, v.5, p. 187-189, 2015.
- MARQUES TC; REIS, A.M.M.; SILVA, A.E.B.C.; GIMENES, F.R.E.; OPITZ, S.P.; TEIXEIRA, C.A; LIMA, R.E.F.; CASSIANI, S.H.B. Erros de administração de antimicrobianos identificados em estudo. Rev. Bras. Cienc. Farm. 2008; 44(2): 305-14. DOI: 10.1590/S1516- 93322008000200016.
- MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- NOVARETTI MCZ, AQUINO S, PISCOPO MR. Controle De Vendas De Antibióticos No Brasil. RASM. 2014; 4(2): 25-39. 14.

PEREIRA, F.C.S.; ABREU, R.S.; FERREIRA, E.G. Pesquisa de *Escherichia coli* no churrasquinho de carne comercializado no centro de Macapá. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, Santa Catarina, v.5, n.2, 2016.

TRUNG, N. V.; NHUNG, H. N.; CARRIQUE-MAS, J. J.; MAI, H. H.; TUYEN, H. T.; CAMPBELL, J.; NHUNG, N.T; MINH, P.V; WAGENAAR, J.A; MAI, N. T. N; HIEU, T. Q; SCHULTZ, C.; HOA, N.T. Colonization of Enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in chickens and humans in southern Vietnam. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 208, 2016.

VELHO, A.L.M.C.S.; ABRANTES. M.R.; MEDEIRAS, J.M.S.; AGUIAR, K.C.S.; SOUSA, Ê.S.; SOARES, K.M.P; SILVA, J.B.A. Avaliação quantitativa de Carne Bovina In Natura comercializado em Mossoró-RN. **Acta Veterinaria Brasilica**. Mossoró, v.9, n.3, p.212-217, 2015.

WHO-World Health Organization global strategy for food safety: safer food for better health. Geneva: World Health Organization, 2002.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE RIO VERDE, GOIÁS

Flávio Barbosa da Silva^{1*}; *Iderval da Silva Júnior Sobrinho*²; *Marcia Dias*³; *Cecília Nunes Moreira*⁴.

*1 Pós-graduandos do curso de Biociência animal, Universidade Federal de Goiás REJ. flaviorcc2009@hotmail.com**

2 Professor Adjunto do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal Goiás, Regional Jataí-GO, Brasil

3 Professora Associada do curso de Zootecnia da Universidade Federal Goiás, Regional Jataí, -GO, Brasil

4 Professora Associada do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Goiás, Regional Jataí, -GO, Brasil

Resumo

Na cadeia produtiva de aves existem inúmeros desafios sanitários, enteropatógenos como *Salmonella* spp e *Escherichia coli* tornam-se cada dia mais importantes, visto que uma vez instalados na cadeia inicial de produção, podem se disseminar para todas as fases de produção impossibilitando a oferta de um alimento seguro. A identificação da real qualidade microbiológica da carne de frango em especial quando comercializado na forma temperada se faz necessária, visto a escassez de trabalhos abordando esse tipo de matriz analítica, uma vez que essa, pode ser veiculadora de importantes patógenos, devido à grande preferência por parte dos consumidores para esse tipo de proteína processada. Fundamentados nisso, propomos com esse trabalho avaliar as condições sanitárias dos estabelecimentos comercializadores de produtos de carne de frango temperado localizados no município de Rio Verde, Goiás, utilizando como microrganismos alvo *Salmonella* spp e *Escherichia coli*, bem como avaliar itens básicos como data de validade e presença de selo de inspeção municipal. De um total de 80 amostras analisadas, observou-se que 30% (24/80) das amostras de carne de frango temperado foram positivas para a bactéria do gênero *Salmonella* spp e 55% (44/80) das amostras foram confirmadas a presença de *E. coli*. Na identificação das amostras quanto ao seu local de origem observou-se que 63,75% (51/80), tinham sua origem em supermercados, enquanto 36,25% (29/80) eram provenientes de casas de carne. Estratificando apenas as amostras positivas em relação a sua origem, pontuando o agente *Salmonella* spp. nota-se que 27,45% (14/51) eram de supermercado e 34,48% (10/29) de casas de carne, e para o agente *Escherichia coli*, 49,01% (25/51) das amostras positivas eram de supermercado enquanto 65,55% (19/29) de casas de carne. Quanto a presença do selo de inspeção municipal, (SIM), 80% (64/80) das amostras apresentavam o selo, contra 20% (16/80) que não o apresentavam. E no critério validade foi observado, que 83,75% (67/80) continha data de validade e apenas 16,25% (13/80) não apresentava essa informação. A legislação em sua narrativa, garante proteção para o consumidor no que diz respeito a presença de sorotipos patogênicos desse agente, porém, vale ressaltar que a ação efetiva de vigilância em saúde, e a constante investigação laboratorial dos produtos são necessárias.

Palavras-chave: saúde pública, segurança alimentar, vigilância sanitária.

1 INTRODUÇÃO

A produção de alimentos de qualidade e que sejam seguros aos consumidores representa o maior desafio para os estabelecimentos do setor de alimentação. Fazer frente a esse desafio requer alto grau de comprometimento por parte de todos os envolvidos nos processos de elaboração e oferecimento de alimentos (Gonçalves, 2014).

Doenças de veiculação alimentares têm sido causa de investigações e pesquisas para que agentes etiológicos e fatores correlatos sejam identificados e analisados. O conhecimento dos fatores envolvidos no processo é importante para estabelecer os mecanismos de prevenção e controle (Medeiros et al., 2017).

Condições higiênicas sanitárias em que o alimento é produzido, manipulado e comercializado, interferem diretamente na qualidade microbiológica desses alimentos, e consequentemente, a falta de cuidado nesses aspectos pode trazer riscos à saúde do consumidor (Zuldt, 2014).

A carne de frango é um produto fundamental na dieta alimentar de praticamente todos os países e por tal motivo ocorre um constante crescimento da produção mundial de frango. O Brasil tornou-se o segundo maior produtor mundial de frangos, porém esta carne pode se tornar veículo de transmissão de inúmeros microrganismos caso sejam negligenciados os procedimentos sanitários durante o alojamento das aves nas granjas, a fase de manejo pré-abate e as operações de abate de forma adequada (Brasil, 2017).

Os agentes biológicos mais comumente citados nos casos de DVA'S são bactérias, vírus, toxinas, parasitas e substâncias tóxicas. Sendo as bactérias os agentes com maior relação dos casos e dentre elas as mais comuns a *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*. *Salmonella* spp e *Escherichia coli* são agentes patogênicos comuns a vários animais e inclusive humanos, sendo, portanto, patógenos de relevância em saúde pública e animal em todo o mundo (Brasil, 2014, Lammie, 2016).

Salmonella é um dos gêneros mais destacados da família *Enterobacteriaceae*, presente na microbiota intestinal de animais e humanos. É um patógeno de significância mundial, de ampla distribuição no ambiente, em que os alimentos são os principais veículos de sua transmissão. Há mais de 2.600 sorovares identificados de *Salmonella*, sendo todos considerados como potencialmente patogênicos (Brasil, 2018). *Escherichia coli* bactéria Gram negativa que normalmente habitam a microbiota intestinal do homem e de animais, sendo tipicamente não patogênicas. Entretanto, subgrupos de *Escherichia coli* apresentam fatores de virulência que os tornam capazes de causar doenças (Caldorin, 2013).

O conhecimento dos requisitos e técnicas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) de alimentos é fundamental para que haja conscientização e habilidades necessárias à prevenção de perigos nos alimentos servidos ao consumo coletivo. Este conhecimento abrange também, o de doenças transmitidas por alimentos, bem como de micro-organismos patogênicos (Gonçalves, 2014).

O controle higiênico sanitário dos estabelecimentos produtores de alimento é fiscalizado e inspecionado pelos serviços de inspeção. O serviço de inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal é estruturado em função da área de abrangência da comercialização da produção. O serviço de inspeção municipal (SIM) deve controlar a qualidade dos produtos de origem animal comercializados no município, além de incentivar as pequenas empresas e empreendedores a saírem da clandestinidade (Brasil, 1989).

A exigência de que os municípios implantem esse serviço é antiga, mas a realidade é diferente da legislação. A adesão ao SIM é de extrema importância para a agroindústria, pois é uma garantia da qualidade dos produtos. Além da questão higiênico-sanitária, existe a necessidade da habilitação dos produtores para a participação em programas federais como o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) e o Programa de Aquisição de Alimentação (PAA) (Prezotto & Nascimento, 2013).

O Município de Rio Verde/Goiás, há mais de 20 anos destaca-se nacionalmente na atividade do agronegócio, crescendo desordenadamente do ponto de vista populacional e estrutural. Assim, mudanças baseadas no controle operacional e minimização de possíveis riscos e agravos à saúde da população foram necessárias. Em 2006, o município implantou o serviço de inspeção municipal, sendo o primeiro do estado, mas o serviço foi regulamentado somente em 2009, sendo registrado o primeiro estabelecimento com certificado do serviço de inspeção municipal (SIM) apenas em 2011 (VISAM, 2015).

Os fatores determinantes para o surgimento das DVAs são inúmeros, bem como a compreensão dos reais perigos durante a ingestão de alimentos de origem animal. Fundamentados nisso, propomos com esse estudo avaliar a qualidade microbiologia da carne de frango temperado comercializada no município de Rio Verde, Goiás, utilizando como microrganismos alvo *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, determinando as possíveis diferenças entre os estabelecimentos atendidos pelo serviço de inspeção municipal (SIM), entre aqueles que não possuam esse serviço, avaliando a forma de disposição dos alimentos encontrados disponíveis para comércio, bem como a presença de data de validade e o tipo de estabelecimento entre outros aspectos que possam contribuir para a segurança do consumidor.

2 MATERIAIS E MÉTODO

Foram avaliadas 80 amostras de carne de frango temperado de 40 estabelecimentos comerciais escolhidos de forma aleatória sendo esses supermercados ou casas de carne. As coletas foram realizadas em duas etapas e o experimento foi realizado no Laboratório de Práticas Veterinárias da Universidade Federal de Jataí (UFJ).

As amostras foram adquiridas por meio de compra sendo uma porção média de 200 gramas, conforme estabelecido ANVISA (RDC 12), na forma a granel. Foi preenchido um formulário com descrição da data, hora da coleta, tipo de corte, rotulagem e origem. Não foi aplicado questionário e foi mantido sigilo sobre a identidade dos estabelecimentos.

As amostras foram processadas pelo isolamento bacteriano convencional segundo a *International Organization for Standardization* (ISO) 6579: 2002, para confirmação do agente *Salmonella* spp. Já para a determinação de *Escherichia coli*, as amostras foram processadas seguindo a metodologia prevista pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA – IN nº 62/2003).

Os dados foram computados no programa Sistema de Análises Estatísticas – SAS v. 9.3 (2010) a 5% de probabilidade. Foi usado o qui-quadrado de Mantel-Haenzsel para tendência linear e "razão de chances" (OR), para avaliar os prováveis fatores de risco ambientais e de manuseio, na prevalência de *Salmonella* spp e *Escherichia coli*.

Os critérios de avaliação das amostras de carne de frango temperado foram classificados a partir da presença ou ausência de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Outras variáveis foram avaliadas sendo essas o local (supermercados e casa de carne), presença ou ausência de selo de inspeção municipal (SIM) e data de validade.

Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão específica de agências de fomento no setor público, comercial ou setores sem fins lucrativos.

3 Resultados e Discussão

De acordo com o isolamento bacteriano convencional, observou-se que 30% (24/80) das amostras de carne de frango temperado foram positivas para *Salmonella* e 55% (44/80) amostras foram confirmadas a presença de *E. coli*.

Correlacionando com os dados encontrados na pesquisa com os dados apresentados recentemente pelo Ministério da Saúde, nota-se semelhanças entre eles. Ao serem elencados os principais agentes causadores de DVA no Brasil, no período compreendido entre o ano de 2007 a 2017, foi observado que o agente *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* lideram os números de casos de surtos registrados e confirmados no país sendo um percentual de 7,5% para casos envolvendo *Salmonella* spp e 7,2% para *Escherichia coli*, demonstrando a permanência desses agentes nos alimentos sendo um potencial risco para a população que consome esse tipo de alimento (Brasil, 2017).

Abordando as positivities para *Salmonella* spp. e comparando-as a outras pesquisas semelhantes, permite-se considerar que a diferença nos resultados encontrados, pode ser justificada por diversos fatores inerentes às instalações encontradas nos diferentes estabelecimentos visitados, bem como a existência ou ausência de boas práticas de fabricação, e sobretudo dos cenários e metodologias diagnósticas realizadas para essa determinação. Bau et al. (2001) ao analisar 124 amostras de carne de frango em um experimento similar desenvolvido na região sul do país, observou prevalência de 10,48% (13/124) de amostra de carne de frango contaminadas pelo agente *Salmonella* spp.

Moreira (2014), em estudo realizado na cidade de Goiânia ao avaliar 100 carcaças no município por meio dos ensaios analíticos empregados (triagem + confirmação) foi possível obter 21 isolados de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos resfriadas.

Ainda se referindo ao perfil microbiológico no estado, Portilho (2016), avaliando a produção de cortes de frango temperado em estabelecimentos do município de Rio Verde, Goiás identificou em sua pesquisa a presença de *Salmonella* spp. em carne de frango temperado, determinando em um total de 30 estabelecimentos visitados uma positividade 80% (24/30) para o agente em questão.

Os resultados para o agente *Escherichia coli*, ao serem comparados com os autores apresentaram diferenças consideráveis. Souza et al. (2002) determinaram que em 60 cortes de carne de aves adquiridos no comércio varejista da cidade de João Pessoa - PB, há prevalência de 95% (57/60) das amostras positivas para *E. coli*.

Entretanto, resultados inferiores foram relatados por Beraldo-Massoli et al. (2014), ao avaliar 54 amostras de frango na cidade de Jaboticabal – São Paulo, onde se obteve a positividade de apenas 18,5% para *Escherichia coli*. Resultados distintos foram descritos por Younis et al. (2017), ao analisarem 120 amostras de carnes de frangos no Egito, determinando que apenas 11,66% (14/120) das amostras estavam contaminadas com a *Escherichia coli*.

Essas diferenças entre os resultados abordados na discussão, ressalta que as diferentes formas de processamento, armazenamento e comercialização das amostras, são determinantes para a qualidade microbiológica do produto final.

Na identificação das amostras quanto ao seu local de origem observou-se que 63,75% (51/80), tinham sua origem em supermercados, enquanto 36,25% (29/80) eram provenientes de casas de carne. Estratificando apenas as amostras positivas em relação à sua origem, pontuando o agente *Salmonella* spp. nota-se que 27,45% (14/51) eram de supermercado e 34,48% (10/29) de casas de carne. Já para o agente *Escherichia coli*, 49,01% (25/51) das amostras positivas eram de supermercado enquanto 65,55% (19/29) de casas de carne.

No experimento proposto por Bau et al. (2001) 6,06% (4/66) eram de supermercado e 15,51% (9/58) proveniente de casas de carne, propondo que o aumento nas amostras positivas para os agentes em questão se dá pelas diferenças na manipulação existentes nos dois tipos de estabelecimentos. Nas casas de carne, são comuns práticas de manipulação inadequadas e variações nas temperaturas de conservação dos produtos, o que favorece a multiplicação de micro-organismos. Enquanto nos supermercados, os produtos de frangos estão embalados em plásticos e bem refrigerados ou congelados, o que reduz a contaminação cruzada e retarda a multiplicação bacteriana.

As amostras foram classificadas quanto à presença do selo de inspeção municipal (SIM), sendo 80% (64/80) das amostras apresentavam o selo, contra 20% (16/80) que não o apresentavam. O critério validade também foi observado, no qual 83,75% (67/80) continha data de validade e apenas 16,25% (13/80) não apresentava essa informação.

Quanto à atuação do SIM, Portilho (2016) relatando a implantação do serviço de inspeção no município de Rio Verde, GO e avaliando sua eficácia, estipulou a pesquisa de *Salmonella* spp. em carne de frango temperado, determinando em um total de 30 estabelecimentos visitados uma positividade 80% (24/30) para o agente em questão.

Ao contestar o SIM foi reavaliado quanto à proposta de implantação do mesmo, no qual Prezotto e Nascimento (2013), sugerem estabelecer um cronograma de envio de amostras de água e de produtos, para análises físico-químicas e microbiológicas dos estabelecimentos sob

responsabilidade do SIM. Estes deveriam, em uma frequência compatível com o risco oferecido por cada produto e/ou estabelecimento enviar amostras para laboratórios credenciados, etapas essas que foram negligenciadas durante a implantação do serviço no município, o que pode ter contribuído para essa positividade encontrada.

De acordo com a legislação vigente a Secretaria da Agricultura Pecuária e Abastecimento (SEAMA) poderia celebrar convênios com entidades públicas ou privadas possuidoras de laboratórios, credenciadas junto ao MAPA. Na impossibilidade de celebração de convênio, as amostras deveriam ser enviadas para análise em laboratórios particulares, credenciados junto ao MAPA. A legislação é enfática, o SIM deve exigir análises laboratoriais periódicas e/ou complementares cujo custo financeiro será de responsabilidade do estabelecimento (VISAM, 2015).

Preocupação também foi observada no que diz respeito à rotulagem do produto. As amostras em questão foram encontradas de forma a granel, caracterizando o reprocessamento do produto ao chegar nos mercados, perdendo assim a garantia do selo de inspeção de seu local de origem. Porém embora 80% (64/80) dos estabelecimentos visitados apresentassem SIM, nenhum dos estabelecimentos, apresentava rotulagem indicando as condições de preparo, armazenamento e possível risco de se consumir o alimento cru. Prerrogativa essa obrigatória prevista pela RDC 13.

Avaliando o efeito das variáveis tipo de estabelecimento, validade e inspeção do produto sobre a presença de *Salmonella* spp e *Escherichia coli*, utilizando o modelo completo de regressão logística, constatou-se que não houve diferença significativa para nenhum fator analisado (Tabela 01).

Tabela 01 Presença de cada agente em função do estabelecimento, validade e inspeção ($P < 0,05$)

Agentes	***	Estabelecimento	Validade	Inspeção
<i>Salmonella</i> spp	Valor P	0,6431	0,5458	0,3083
<i>Escherichia coli</i>	Valor P	0,2126	0,6791	0,2718

Aplicando o teste para obtenção dos valores do coeficiente de correlação de *Spearman* entre o tipo de inspeção, a validade e o local de origem da amostra de corte de frango analisada, nota-se que ocorreu correlação positiva de moderada magnitude entre os fatores: (validade e local / $R = 0,44317$) e de moderada magnitude entre (tipo de inspeção e validade / $R = 0,42135$) ambos com $P < 0,0001$ (Tabela 02).

Tabela 02 Coeficiente de correlação de Spearman entre o tipo de inspeção, a validade e o local de origem.

	Local		Inspeção		Validade	
Local	1		P=0,5770	R= 0,06330	P<0,0001	R = 0,44317
Inspeção	P=0,5770	R= 0,06330	1		P<0,0001	R=0,42135
Validade	P<0,0001	R = 0,44317	P<0,0001	R=0,42135	1	

A presença desses micro-organismos no produto final desperta a preocupação de possíveis falhas no controle desse agente, desde sua criação, em que podemos observar que a permanência de animais infectados, pode desencadear uma contaminação em toda a cadeia de produção, bem como levar esse agente para as plantas frigoríficas e, por conseguinte ao consumidor final.

Lázaro et al. (2008) consideram que a via de transmissão desses micro-organismos para seres humanos pode estar associada à cadeia alimentar, salientam que o fator mais preponderante são os animais de produção infectados sem manifestação de sinais clínicos o que dificulta a detecção antes ou durante o abate, e tornam estes animais fontes constantes de contaminação ao ambiente e consequentemente aos alimentos.

Moraes et al. (2014) avaliando a distribuição de enteropatógenos como a *Salmonella* sp. em todo o processo de produção avícola, considerando como unidade amostral mecônio e pintos de corte de um dia; bem como ingluvíos e cecos obtidos em abatedouros e suabes de arrasto de criadouros e abatedouros do estado de Goiás, obtiveram resultados positivos para *Salmonella* spp. em todas amostras estudadas. Constando que o isolamento de *Salmonella* spp. em amostras de pintos de um dia, antes do alojamento, compromete todo o processo sanitário do plantel, pois o mesmo dissemina o agente em toda a extensão da cadeia produtiva comprometendo o aspecto sanitário dos aviários bem como da indústria e seu produto final.

A problemática da contaminação de unidades frigoríficas é um ponto importante a ser observado uma vez, que o local de beneficiamento desses animais deve garantir a segurança microbiológica, visto a intensa manipulação das carcaças nessa fase do processamento, podendo essas serem passíveis de condenação ainda na planta frigorífica trazendo importantes prejuízos financeiros para as empresas processadoras de proteína animal.

Souza et al. (2014) avaliando a origem da carga microbiana de carcaças de frangos e seus derivados relataram que a origem da microbiota presente em carcaças de aves, é principalmente proveniente de aves vivas ou incorporadas em qualquer uma das fases do abate, sendo as mais críticas a escaldagem, a depenagem e a evisceração.

Oliveira (2016) ao realizar um levantamento epidemiológico para caracterizar as principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal no período compreendido entre 2006 e 2011, observou que entre as principais causas destacam-se as contaminações (1,80%), seguidos de contusão/lesão traumática (1,57%), dermatose (0,74%) e celulite (0,50%).

Zweifel, Althaus e Stephan, (2015); Belluco et al., (2016), após aplicação de estudos correlatos, sobre os efeitos das operações de abate sobre a contaminação microbiológica de carcaças de frangos em três abatedouros em um período de quatro meses, apontaram que as maiores contagens de micro-organismos no abate de aves são evidenciadas entre as etapas de escaldagem e evisceração.

Pacholewicz et al. (2016) salientou que é indesejável a contaminação das carcaças durante o abate, no entanto é inevitável que ela ocorra, por isso se faz necessário aplicar medidas para prevenir e reduzir essa contaminação, como por exemplo ter boa regulagem das máquinas de evisceração e mão de obra treinada na operação dessas máquinas.

Embora o enfoque da pesquisa seja o produto final, tais informações reforçam que o cuidado com a segurança do alimento deve ser iniciado ainda nos estágios finais da produção, garantido assim a inocuidade do produto final. Pereira (2016) ressaltou que na produção em larga escala a contaminação dos alimentos tem seu início na produção da própria matéria prima, pois durante a manipulação pode ocorrer uma série de fatores relacionados à falta de higiene dos equipamentos e até mesmo de quem os manipula, estendendo-se até as etapas de armazenamento, acondicionamento e distribuição, pois permitem a exposição direta ao ambiente.

A prerrogativa da contaminação cruzada dos alimentos é reportada anualmente pelo Ministério da Saúde, os dados de notificação de surtos de DVA por *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*, demonstram que o principal local de contaminação em surtos alimentares são as residências, afirmando a importância do cuidado que as pessoas devem ter quanto o preparo dos alimentos em casa principalmente durante a manipulação e preparo dos alimentos crus e cozidos (Brasil, 2018).

Conclusões

Visualizando o perfil sanitário dos estabelecimentos utilizados para esse experimento, conclui-se que é necessário uma atuação fiscalizatória ainda mais efetiva, seja ela nas indústrias primárias de beneficiamento de frango, bem como na comercialização nos estabelecimentos varejistas, uma vez que os inúmeros fatores sanitários se aplicam a todas as fases do processo de beneficiamento, armazenamento e comercialização sendo de fundamental importância o cuidado quanto a inocuidade do alimento ofertada ao consumidor.

Os fatores correlacionados abordados nesse trabalho, são apenas alguns que podem interferir na qualidade microbiológica dos alimentos. As condições microbiológicas, bem como fatores relacionados à embalagem são exemplos dos fatores que interferem na segurança alimentar. Embora tenhamos avaliado apenas o produto disposto nos estabelecimentos de consumo final, e baseados na literatura usada para essa discussão, compreende-se que a contaminação dos alimentos pode surgir ainda nas estações primárias da produção dos alimentos.

A legislação mostra uma proteção para o consumidor, mas, vale ressaltar que a ação efetiva de vigilância em saúde, e a constante investigação laboratorial dos produtos em questão, são necessárias pois, os vários fatores de risco, dificultam a delimitação dos reais riscos para a população.

A presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em produtos destinado ao comércio final é uma preocupação quando avaliamos os potenciais riscos de contaminação cruzada que esses alimentos podem gerar em ambientes domiciliares, escolas, hospitais e ou asilos. Esse impacto é real e vem sendo tratado como ponto crucial para redução dos casos de surtos de DVA causadas por esse tipo de alimento.

Referências

- Baú, A.C.; Carvalhal, G.B.; Aleixo, J.A.C. Prevalência de Salmonella em produtos de frango e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, p. 303-307, 2001.
- Belluco, S., Barco, L., Roccato, A., Ricci, A. *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae counts on poultry carcasses along the slaughterline: A systematic review and meta-analysis. *Food Control*. v. 60, p. 269-280, 2016.
- Beraldo-Massoli, M. C.; Cardoso, M. V.; Cavani, R.; Gomes, M. D. O. S.; Schocken-Iturrino, R. P. Qualidade microbiológica de frango comercializado na cidade de Jaboticabal, São Paulo. *Investigação*, v. 13, n. 2, 2014.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216/2014: Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde. Diário oficial da união, 18 nov, 2014.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmitidas por Alimentos. Apresentação surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos do ano de 2007 a 2017. Disponível em: [http:// portal.saude.gov.br/portal/62arquivos/pdf/apresentacao_dta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/62arquivos/pdf/apresentacao_dta.pdf). > Acesso em: 04 jul 2018.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 13/2001: 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, 02 jan, 2001.
- Brasil. Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989. Dispõe sobre a inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal, e dá outras providências. Brasília, DF, 1989.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 70, 10 de outubro de 2003. Dispõe sobre os Programa de redução de patógenos- monitoramento microbiológico - controle de Salmonella sp. em carcaças de frangos e perus. Diário Oficial da União, Brasília, 10 out. 2003 Seção 1, p. 9.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica Salmonella CRISC – Entenda melhor Salmonella. Diário Oficial da União, Brasília, 12 de março de 2018 Seção 1, p. 6. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/entenda-melhor-salmonela-em-carne-de-frango2012.03.2018.pdf>> Acesso em: 29 jul 2018.
- Caldorin M, Almeida I.A.Z.C., Peresi JTM, Alves EC. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. *Bol Epidemiol Paul*, v.10, n. 110, p.4-20, 2013.
- CLSI/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 3rd ed. v.28, n.8, p.1-99, 2007.

Gonçalves, E.; Sarmiento, C.M.P.; Ferreira, F.A.B.; Diagnóstico do conhecimento das boas práticas de fabricação dos profissionais de alimentação da cidade de Medianeira – PR. Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR - Campus Medianeira, v. 9, n. 18, p 13-17, abr-jun, 2014.

International Organization For Standardization. ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4th ed. Geneva, 2002.

Lammie S.L.; Hughes JM. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. Annual review Food Science and Technology, v.7, p.287-312, 2016.

Lázaro, N.S.; Reis, E.M.F.; Pereira, C.S.; Rodrigues, D.P. Gênero *Salmonella*: características epidemiológicas e laboratoriais [online], 2008. Disponível em: http://bvs.panalimentos.org/local/file/INCLUSIONES2008/2GSS_CURSO_CAPACITACAO_NIVEL3_BRASILIA2008_estanaBVS/GSS_2008_pdf/Manual%20Salmonella%20GSS%202008%20doc...pdf. Acesso em: 22 de jul de 2018.

Medeiros, M.G.A.; Carvalho, L.R.; Franco, R.M. Percepção sobre a higiene dos manipuladores de alimentos e perfil microbiológico em restaurante universitário. Ciência & Saúde Coletiva, 22(2):383-392, 2017.

Moraes, D.M.C.; Andrade, M.A.; Rezende, C.S.M.; Barnabé, A.C.S.; Jayme, V.S.; Nunes, I.A.; Batista, D.A. Fontes de infecção e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. isoladas no fluxo de produção de frangos de corte. Animal Pathology / Scientific Article Arquivo Instituto Biológico, São Paulo, v.81, n.3, p. 195-201, 2014.

Moreira, N. M.; Rezende, C. S. M.; Matos, MPC.; Nunes, I.A. Identificação e perfil de suscetibilidade de *Salmonella* sp. isoladas de carcaças de frango comercializadas em distritos de Goiânia. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal (EVZ)– Universidade Federal de Goiás, 80 f., Goiânia, 2014.

Oliveira, A.A.; Andrade, M.A.; Armendaris, P.M.; Bueno, P.H. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. Ciência animal brasileira, Goiânia, v.17, n.1, p. 79-89 jan./mar. 2016.

Pacholewicz, E.; Barus, S. A. S.; Swart, A.; Havelaar, A. H.; Lipman, L. J. A.; LuninG, P. A. Influence of food handlers' compliance with procedures of poultry carcasses contamination: A case study concerning evisceration in broiler slaughterhouses. Food Control. v. 68, p. 367-378, 2016.

Pereira, F.C.S.; Abreu, R.S.; Ferreira, E.G. Pesquisa de *Escherichia coli* no churrasquinho de carne comercializado no centro de Macapá. Revista Eletrônica Estácio Saúde, Santa Catarina, v.5, n.2, 2016.

Prezotto, L. L.; Nascimento, M. A. R. Manual de Orientações Sobre Constituição de Serviço de Inspeção Municipal (SIM), Brasília, março de 2013.

Portilho, E.F.; Vidal, A.M.C. Análise retrospectiva da implantação do serviço de inspeção municipal de Rio Verde – GO e de microrganismos patogênicos em produtos cárneos. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – UNESP) Universidade Júlio de Mesquita, 80 f., Jaboticabal, 2016.

Souza, G.C.; Gonsalves, H.R.O.; Gonsalves; H.E.O.; Coêlho; J.L.S. Característica microbiológica da carne de frango. ACSA – Agropecuária Científica no Semiárido, v. 10, n. 1, p. 12-17, jan - mar, 2014.

- VISAM, Vigilância Sanitária Municipal de Rio Verde – GO, Secretaria da Saúde, Rio Verde, 2015.
- Younis, G. A.; Elkenany, R. M.; Fouda, M. A.; Mostafa, N. F. Virulence and extended-spectrum β -lactamase encoding genes in *Escherichia coli* recovered from chicken meat intended for hospitalized human consumption. *Veterinary world*, v. 10, n. 10, p. 1281, Egito, 2017.
- Zundt M, Firetti R, Martins TR, Cardoso DT, Angelo BA, Rego FCA, et al. Qualidade microbiológica e química da carne de ovinos de duas diferentes procedências comercializada em Presidente Prudente – SP. *Coll Agrariae*.2014;10(2):75-83.
- Zweifel, C.; ALTHAUS, D.; STEPHAN, R. Effects of slaughter operations on the microbiological contamination of broiler carcasses in three abattoirs. *Food Control*. V. 51, p. 37-42, 2015.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Salmonella* spp. EM CORTES DE FRANGO TEMPERADO COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE RIO VERDE, GOIÁS

Flávio Barbosa da Silva^{1*}; Iderval da Silva Júnior Sobrinho²; Marcia Dias³; Cecília Nunes Moreira⁴.

¹ Pós-graduandos do curso de Biociência animal, Universidade Federal de Goiás REJ. flaviorcc2009@hotmail.com*

² Professor Adjunto do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal Goiás, Regional Jataí-GO, Brasil

³ Professora Associada do curso de Zootecnia da Universidade Federal Goiás, Regional Jataí, -GO, Brasil

⁴ Professora Associada do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Goiás, Regional Jataí, -GO, Brasil

Resumo

A demanda por uma alimentação de baixo custo e de rápida produção tem contribuído de forma significativa para o advento da avicultura, porém junto a esse crescimento junta-se a premissa da segurança do alimento. Na cadeia produtiva de aves nos deparamos com importantes desafios sanitários, dentro deles a busca pela condição de ausência do agente *Salmonella* spp. nos produtos de origem avícola se torna um desafio cada vez mais árduo, visto que uma vez instalado na cadeia inicial de produção, esse agente pode se disseminar para todas as fases de produção impossibilitando a oferta de um alimento livre desse agente. Fundamentados nisso, propomos com esse trabalho avaliar a qualidade microbiológica da carne de frango temperado comercializada no município de Rio Verde, Goiás visto a escassez de trabalhos abordando esse tipo de matriz analítica, uma vez que essa, pode ser veiculadora de importantes patógenos, devido à grande preferência por parte dos consumidores para esse tipo de proteína processada, utilizando como microrganismo indicador *Salmonella* spp., realizando nos isolados a determinação do perfil de resistência bacteriana dos agentes encontrados e analisando os fatores de risco associados. Em um total de 80 amostras, foram confirmadas a presença de *Salmonella* spp., em 24 amostras, correspondendo a 30% do total analisado. Na caracterização molecular realizada pela técnica de PCR convencional não foi encontrado *Salmonella* Typhimurium ou *Salmonella* Enteritidis. Ao aplicarmos a técnica de Check & Trace foi possível identificar a presença de *Salmonella* Heidelberg com 58% de prevalência, seguido dos sorovares *Salmonella* Minnesota 21%, *Salmonella* Muenchen 17%, *Salmonella* Mbandaka 4%. Quanto à resistência antimicrobiana, 70,8% (17/24) foram consideradas multirresistentes, 16,6% (4/24) resistentes e apenas 12,5% (3/24) sensíveis aos antimicrobianos analisados. A legislação em sua narrativa, garante uma proteção para o consumidor no que diz respeito à presença de sorotipos patogênicos desse agente, porém, vale ressaltar que a ação efetiva de vigilância em saúde, e a constante investigação laboratorial dos produtos são necessárias. Além disso a alta resistência aos antimicrobianos, alerta para o uso consciente desses recursos na produção animal.

Palavras-chave: saúde pública, segurança alimentar, vigilância sanitária.

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de oferta de alimentos em boas condições sanitárias é um importante fator para a conservação da saúde do consumidor, devendo seguir critérios básicos de higiene. Os princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), o Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) são fatores importantes e devem ser adotados. É importante ressaltar que o sistema de inspeção deve ser realizado em conjunto com outras ferramentas, garantindo a qualidade do produto (Levinger, 2005; Oliveira, 2012).

As condições higiênicas sanitárias em que o alimento é produzido, manipulado e comercializado, interferem diretamente na qualidade microbiológica desses alimentos, e consequentemente, a falta de cuidado nesses aspectos higiênico sanitários podem trazer riscos à saúde do consumidor (Monte, 2008; Zundt, 2014).

Com destaque nacional e internacional, a avicultura industrial vem reforçando a importância da oferta de um produto salubre, visto que os produtos de origem avícola são de fácil acesso às diversas classes sociais levando-se em consideração os critérios de disponibilidade e preço. Neste contexto, vale ressaltar que mais de 80% do frango consumido no Brasil possui a chancela do SIF. Apenas no ano de 2017 foram abatidas mais de 5 bilhões de aves em estabelecimentos com SIF (UBABF, 2013; EMBRAPA, 2018).

Salmonella é um dos gêneros mais destacados da família Enterobacteriaceae, que compõem a microbiota intestinal de animais e humanos. É um patógeno de significância mundial, de ampla distribuição no ambiente, sendo que os alimentos são os principais veículos de sua transmissão. Há mais de 2.600 sorovares identificados de *Salmonella*, sendo todos considerados como potencialmente patogênicos (Brasil, 2018).

A presença de *Salmonella* spp. em carne de aves é um problema mundial, e atualmente não possui medidas efetivas de controle. Para garantia de comércio e baseando em legislações de outros países a ANVISA aprovou no ano de 2001, o regulamento técnico número 13 (RDC 13) denominado: Instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados. Essa medida obriga os produtores de carne de aves a incluir na rotulagem, as instruções de uso, preparo e conservação, como recomendações, que auxiliem o consumidor no controle do risco associado ao consumo de alimentos nos quais a *Salmonella* spp. possa estar presente (Brasil, 2001a).

O Programa de redução de patógenos estabelecido pelo MAPA, monitora e controla *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus”, e permite, o abate e comércio na forma *in natura* de lotes positivos para *Salmonella* spp., exceção feita para os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, que deve ser realizado em separado dos demais lotes, seguido de imediata higienização das instalações, e destinação do produto para tratamento térmico que garanta a eliminação desses patógenos ou fabricação de carne mecanicamente separada, uma vez que esses sorotipos são de grande importância para a saúde pública (Brasil, 2016).

Infecção por *Salmonella* spp em aves pode ter diversas origens numa granja comercial e em abatedouros, por isso a diversidade de sorotipos encontrados em cada região é muito variável. No Brasil, existem estudos determinando a diversidade de sorotipos na região sul e centro-oeste, no entanto pela vasta extensão do país e variedade nos tipos de produção animal, são observadas diferenças entre os sorotipos encontrados e isolados em cada estudo (Kich et al., 2011; Faria, 2013).

Em vista do extenso número de sorotipos isolados de aves e de seus subprodutos, vários padrões de suscetibilidade aos antimicrobianos e desinfetantes comuns podem ser observados. A utilização indiscriminada de antibióticos por longos períodos em caráter terapêutico e profilático é um fato que determina os mais altos índices de resistência de *Salmonella* spp isoladas nestes animais (Zhao et al., 2007; Faria, 2013).

Riscos como esses, mostram a importância de uma vigilância sanitária atuante. Os fatores determinantes para o surgimento das DVA são inúmeros, bem como a compreensão dos reais perigos durante a ingestão de alimentos de origem animal. Fundamentados nisso, propomos com esse trabalho avaliar a qualidade microbiologia da carne de frango temperado comercializada no município de Rio Verde, Goiás, utilizando como microrganismo indicador *Salmonella* spp., realizando a caracterização do perfil de resistência bacteriana das cepas e os fatores de risco associados a contaminação da carne com *Salmonella* spp.

2 MATERIAIS E MÉTODO

O experimento foi realizado no Laboratório de Práticas Veterinárias e no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Jataí (UFJ). Foram avaliadas 80 amostras de carne de frango temperado de 40 estabelecimentos comerciais escolhidos de forma por meio de uma listagem contendo todos os estabelecimentos que comercializam produtos de origem animal na cidade, sendo essa composta por um total de 60 estabelecimentos, os quais foram sorteados de forma aleatória e classificados como supermercados e casa de carne, sendo visitados semanalmente 10 estabelecimentos de cada região.

As amostras foram adquiridas por meio de compra de porção de 200 gramas, conforme estabelecido ANVISA (RDC 12), sendo todas dispostas para compra na forma a granel. Para a identificação adequada das amostras, no momento da aquisição dos alimentos, foi preenchido um formulário com descrição da data, hora da coleta, tipo de corte, rotulagem e origem (Anexo 1). Não foi aplicado questionário aos funcionários ou proprietários dos estabelecimentos e foi mantido o absoluto sigilo sobre a identidade dos estabelecimentos envolvidos no projeto.

As amostras foram processadas pelo isolamento bacteriano convencional segundo a *International Organization for Standardization* (ISO) 6579:2002, e as amostras confirmadas como *Salmonella* spp. foram armazenadas em ágar conservação mantidas sob congelamento e enviadas para o laboratório de genética na Universidade Federal de Jataí para identificação genotípica pela técnica de PCR convencional, a fim de caracterizar os sorovares *S. Typhimurium* (ST) e *S. Enteritidis* (SE).

A extração de DNA de cada colônia foi realizada pelo método da fervura segundo Olsvick & Strockbine (1993) e a qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em uma reação contendo água ultrapura, tampão 10x, MgCl₂(25mM), dNTP (2mM cada), BSA (1 mg/ml), primer (6 µM) de cada, Taq DNA pol. (5 U/ µl), DNA *Salmonella* (2 µl). Os ciclos de amplificação foram realizados seguindo o padrão de aquecimento empregados no termociclador iniciando a 94°C por 3min, seguindo para o protocolo de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 1 min. A reação foi finalizada a 72°C por 10 min para a extensão final e manutenção a 4°C por tempo indeterminado até a retirada da reação do termociclador.

Com o intuito de otimizar o protocolo de amplificação, as amostras individuais de DNA foram agrupadas em um único conjunto de DNA, o qual foi amplificado em duas PCRs independentes, cada qual com seu conjunto específico de primers (*ST_forward* + *ST_reverse*; *SE_forward* + *SE_rerverse*). A qualidade da PCR e os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese

em gel de agarose 1%, utilizando um marcador de tamanho molecular como referência (Ladder 1 kb – Invitrogen). As sequências nucleotídicas dos primers (sequência 5' → 3') utilizados na amplificação dos genes de virulência foram obtidas de SOUMET et al. (1999) com modificações (Quadro 01).

Quadro 1 Sequência gênica dos primers utilizados para identificação dos genovares *S. Typhimurium* (ST) e *S. Enteritidis* (SE).

Gene	FORWARD	REVERSE	pb	CÓDIGO NCBI
ST	CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT	ACTGGTAAAGATGGCT	620	CP01298
SE	GCCGTACACGAGTTATGA	ACCTACAGGGCACAATAAC	250	CP007529

Para a identificação de demais genovares de *Salmonella* spp foi utilizado o método de identificação denominado Check&Trace Salmonella® o qual permite a caracterização molecular das amostras a partir de um de um micro arranjo de DNA predeterminado para identificação exclusiva de *Salmonella* spp (Waattup et al., 2008).

Os isolados de *Salmonella* spp. obtidos foram testados quanto à sensibilidade a antimicrobianos, pelo teste de difusão em ágar Mueller-Hinton (Oxoid®), realizado e interpretado de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (CLSI, 2018).

Doze antimicrobianos foram selecionados, representando sete diferentes grupos farmacológicos, disponíveis em discos impregnados comerciais (Sensidisc®): Aminoglicosídeos – amicacina 30 µg (AMI) e gentamicina 10 µg (GEN); Carbapenemas – imipenem 10 µg (IPM); Cefalosporinas – cefepime 30 µg (CPM) e cefotaxima 30 µg (CTX); Nitrofurantoínas – nitrofurantoína 300 µg (NIT); Penicilinas – ampicilina 10 µg (AMP); Polimixinas - polimixina B 300 µg (POL); Quinolonas – ácido nalidíxico 30 µg (NAL), ciprofloxacina 05 µg (CIP) e norfloxacina 10 µg (NOR).

Classificando as cepas, em três grupos: Multirresistentes (cepas resistentes a mais de três grupos), Resistentes (cepas resistentes até dois grupos) e sensíveis (cepas que apresentam sensibilidade a qualquer um dos grupos).

Os dados foram computados no programa Sistema de Análises Estatísticas – SAS v. 9.3 (2010) a 5% de probabilidade. Foi usado o qui-quadrado de Mantel-Haenzsel para tendência linear e "razão de chances" (OR), para avaliar os prováveis fatores de risco ambientais e de manuseio, na prevalência de *Salmonella* spp.

Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão específica de agências de fomento no setor público, comercial ou setores sem fins lucrativos.

3 Resultados e Discussão

Foi possível caracterizar 30% (24/80) de amostras positivas para *Salmonella* sp. em carne de frango temperado comercializadas no município de Rio Verde, Goiás. Considerando essa alta prevalência pode-se compreender que esses resultados demonstram um potencial risco para a população que consome esse tipo de alimento, uma vez que a incidência de casos de DVA causados pelo gênero *Salmonella* sp. ocupam o segundo lugar no ranking dos surtos notificados no país, segundo dados apresentados pelo Ministério da Saúde após um levantamento entre os anos de 2007 a 2017, em um total de 7.170 casos de DVA, 515 foram causados por *Salmonella* spp (Brasil, 2017a).

A presença de *Salmonella* spp. no produto final desperta a preocupação de possíveis falhas no controle desse agente, desde sua criação, em que podemos observar que a permanência de animais infectados por *Salmonella* sp. pode desencadear uma contaminação em toda a cadeia de produção, bem como levar esse agente para as plantas frigoríficas e, por conseguinte ao consumidor final.

Moraes et al. (2014) avaliando a distribuição de *Salmonella* spp. em todo o processo de produção avícola, considerando como unidade amostral mecônio e pintos de corte de um dia; bem como ingluvíos e cecos obtidos em abatedouros e suabes de arrasto de criadouros e abatedouros do estado de Goiás, obtiveram resultados positivos para *Salmonella* sp. em todas amostras estudadas. Constando que o isolamento de *Salmonella* spp. em amostras de pintos de um dia, antes do alojamento, compromete todo o processo sanitário do plantel, pois o mesmo dissemina o agente em todo a extensão da cadeia produtiva comprometendo o aspecto sanitário dos aviários bem como da indústria e seu produto final.

Embora o enfoque da pesquisa seja o produto final, tal informação reforça que o cuidado com a segurança do alimento deve ser iniciado ainda nos estágios finais da produção, garantido assim a inocuidade do produto final. Lázaro et al. (2008) ao considerar que a via de transmissão de *Salmonella* spp. para seres humanos pode ser associada à cadeia alimentar, salienta que o fator mais preponderante são os animais de produção infectados sem manifestação de sinais clínicos o que dificulta a detecção antes ou durante o abate, tornando estes animais, fontes constantes de contaminação ao ambiente e consequentemente aos alimentos.

Pereira (2016) ressalta que na produção em larga escala a contaminação dos alimentos tem seu início na produção da própria matéria prima, pois durante a manipulação pode ocorrer uma série de fatores relacionados à falta de higiene dos equipamentos e até mesmo de quem os manipula, estendendo-se até as etapas de armazenamento, acondicionamento e distribuição, pois permitem a exposição direta ao ambiente.

A problemática da contaminação de unidades frigoríficas é um ponto importante a ser observado uma vez, que o local de beneficiamento desses animais deve assegurar segurança microbiológica, visto a intensa manipulação das carcaças nessa fase do processamento, podendo essas serem passíveis de condenação ainda na planta frigorífica trazendo importantes prejuízos financeiros para as empresas processadoras de proteína.

Oliveira (2016) ao realizar um levantamento epidemiológico para caracterizar as principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal no período compreendido entre 2006 e 2011, observou que entre as causas destacam-se como principais causas de condenação as contaminações (1,80%), seguidos de contusão/lesão traumática (1,57%), dermatose (0,74%) e celulite (0,50%).

A presença de *Salmonella* sp. em produtos destinado ao comércio final se faz uma preocupação quando avaliamos os potenciais riscos de contaminação cruzada que esses alimentos podem gerar em ambientes domiciliares, bem como escolas, hospitais e ou asilos. Esse impacto é real e vem sendo tratado como ponto crucial para redução dos casos de surtos de DVA causadas por esse tipo de alimento.

A prerrogativa da contaminação cruzada dos alimentos é reportada anualmente pelo Ministério da Saúde, os dados de notificação de surtos de DVA por *Salmonella*, demonstram que o principal local de contaminação em surtos de salmonelose são as residências, afirmando a importância do cuidado que as pessoas devem ter quanto ao preparo dos alimentos em casa principalmente durante a manipulação e preparo dos alimentos crus e cozidos. Estes cuidados devem obrigatoriamente serem impresso em embalagens de produtos avícolas sejam eles carcaças, cortes ou miúdos conforme estabelecidos pela RDC 13/2001 (Brasil, 2017b).

Com o cenário cada vez mais desafiador quanto ao controle de *Salmonella* spp. recentemente foi necessário adaptações na legislação vigente. Os avanços instituídos pela Instrução Normativa nº 20/2016 foi a adoção de medidas específicas de controle em relação à presença dos sorovares *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis que são patógenos de relevância em saúde pública.

Estes sorovares foram associados às infecções em humanos isolados em todo o mundo incluindo no Brasil onde, conforme dados do Ministério da Saúde os resultados da sorotipagem das 2.709 amostras positivas de carne de frango referentes ao programa de Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. (Instrução Normativa nº 70/2003) coletadas entre 2004 e 2010 indicaram 41,93% de *Salmonella* Enteritidis e 8,49% de *Salmonella* Typhimurium reforçaram a necessidade de gerenciar esse risco (Brasil, 2018).

No intuito de identificar esse importante fator de risco nas amostras estudadas, todas as 24 amostras positivas para o agente *Salmonella* spp. foram submetidas a caracterização molecular para identificar a possível presença dos sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Para isso as amostras após sua identificação e confirmação sorológica, foram enviadas para o Laboratório de genética da Universidade Federal de Jataí, onde as mesmas foram submetidas à técnica de PCR convencional. Entretanto, nenhuma das 24 amostras foram positivas para os dois sorovares em questão (figura 1)

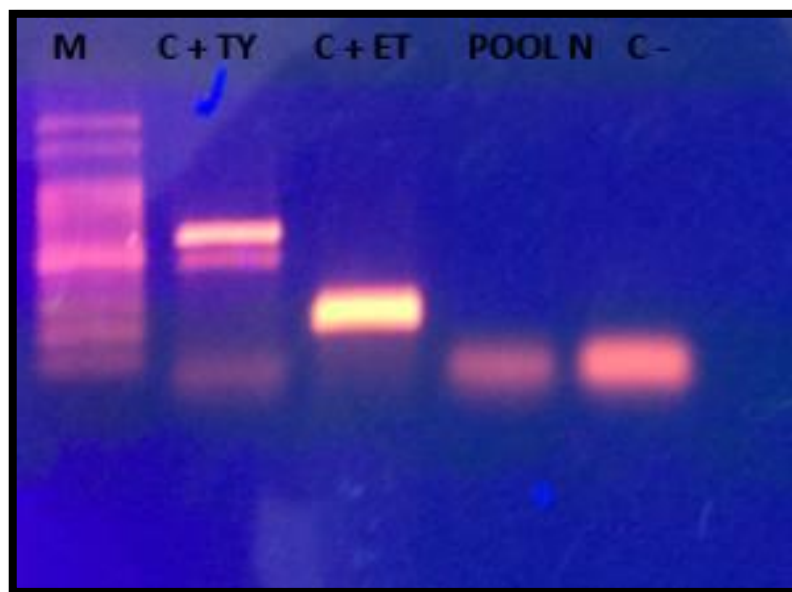


Figura 1: Produtos de PCR da amplificação dos genes ST e SE de *S. Typhimurium* (620 pb) e *S. Enteritidis* (250 pb). Não foram identificadas amostras positivas – **M**: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen); **C+TY**: Controle positivo Typhimurium; **C+ET**: Controle Positivo Enteritidis; **POOL N**: Pool das amostras; **C-**: Controle Negativo (mix sem DNA).

A presença de resultados negativos para esses sorovares fortalece a eficácia do programa de redução de patógenos empregado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Nota-se que o controle na cadeia primária, garante que os animais a serem destinados ao abate apresentem o menor potencial de disseminação deste microrganismo.

As ações estipuladas pelo MAPA, no caso de detecção da presença de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, é que a carne obtida seja destinada a tratamento térmico para eliminação do microrganismo o que justifica a ausência desses sorovares nas amostras estudadas.

Embora os resultados da tipificação genética pela técnica de PCR convencional, não tenham encontrado os sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, as cepas obtidas com a pesquisa foram submetidas a outra técnica molecular para caracterizar o sorotipo de cada cepa. A técnica denominada Check&Trace, permitiu a identificação dos genovares presentes nas amostras analisadas, permitindo assim realizar a identificação dos isolados quanto a seu genótipo.

Na estratificação dos resultados dessa técnica compreendemos que houve um destaque para *S. Heidelberg* com 58% de prevalência, seguido dos sorovares *S. Minnesota* 21%, *S. Muenchen* 17%, *S. Mbandaka* 4% (Gráfico 01).

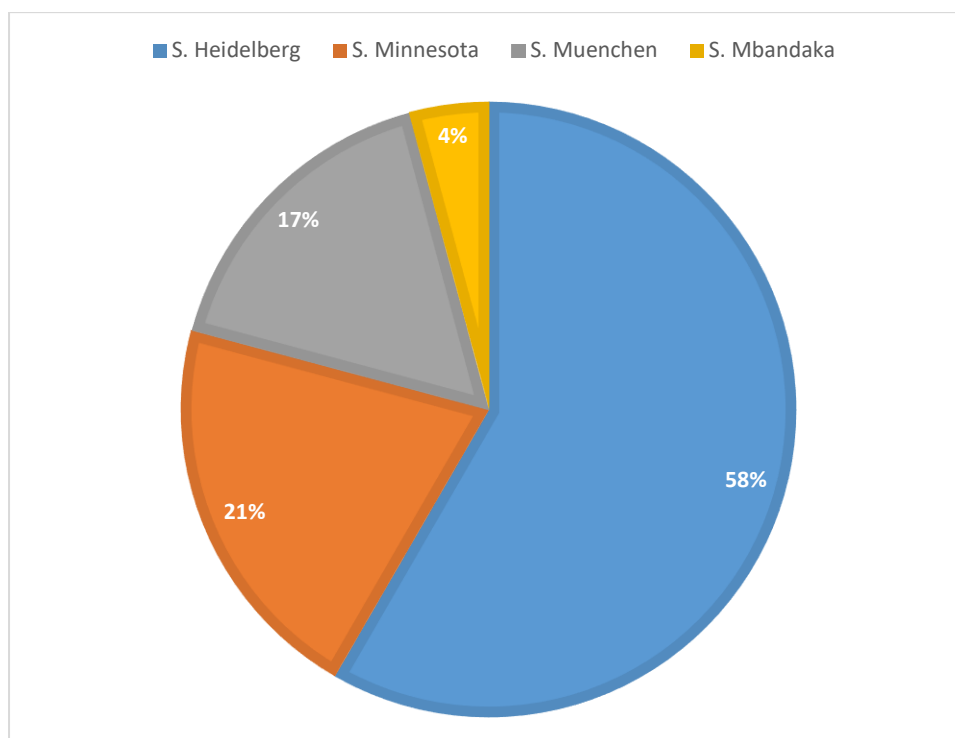


Gráfico 01: Porcentagem dos sorovares encontrados após submissão ao teste molecular.

Ao compararmos a prevalência nacional obtida pela análise oficial do programa de monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos de abate de aves no ano de 2017, notamos grandes semelhanças nos resultados dos sorovares encontrados na pesquisa.

Brasil (2017) ao avaliar 1.495 carcaças de frango coletadas entre abatedouros do Brasil inteiro foi obtido uma positividade de 254 carcaças representando 16,99% de positividade para a presença de *Salmonella* spp. no país. Os sorovares predominantes foram *Salmonella* Heidelberg (56%), *Salmonella* Minnesota (19%) e *Salmonella* Saintpaul (7%).

O sorovar paratíficos são poucos representativos nos casos de toxinfecções alimentares, em nível mundial, atualmente na epidemiologia da doença há o predomínio de poucos sorovares, alguns considerados emergentes, incluindo *S. Heidelberg*. No Brasil os sorotipos de *Salmonella* Heidelberg e *S. Minnesota* são disseminados na produção avícola e estão entre os sorotipos mais frequentemente isolados. A presença de *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* em produtos avícolas do Brasil foi notificada por vários países europeus por meio do Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF, 2017).

Segundo o relatório do Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), *Salmonella* spp obteve prevalência média de 3,03%. Dentre estes, houve a maior prevalência de *S. Heidelberg* (6,4%), *S. Mbandaka* (4,8%) e 15 (5,2%) cepas caracterizadas como *Salmonella* spp (Brasil, 2017b).

Quanto à resistência antimicrobiana, 70,8% (17/24) foram consideradas multirresistentes, 16,6% (4/24) resistentes e apenas 12,5% (3/24) sensíveis aos antimicrobianos analisados. A análise da resistência aos antibióticos foi dada a partir da classificação de desempenho das cepas isoladas a sete diferentes grupos farmacológicos - Aminoglicosídeos (AMN), Penicilina (PNC), Quinolonas (QNL), Cefalosporina (CFL), Carbapenemas (CBP), Nitrofurantoína (NTF), Polimixinas (POL).

Ao analisarmos a formação de halos de inibição pelo método de difusão de discos contendo os antibióticos, foi classificado as cepas, em três grupos: Multirresistentes para cepas resistentes a mais de três grupos farmacológicos, resistentes para cepas resistentes até dois grupos farmacológicos e sensíveis para cepas que apresentam sensibilidade a qualquer um dos grupos testados. Dentro dessa classificação, foi possível determinar as porcentagens de cada cepa em relação ao grupo farmacológico testado. Diante dos resultados, observou-se que a resistência de maior prevalência foi para os grupos farmacológicos, Aminoglicosídeos, Carbapenemas, Nitrofurantoína e Polimixina, com 36%, seguido dos demais grupos (Gráfico 02).

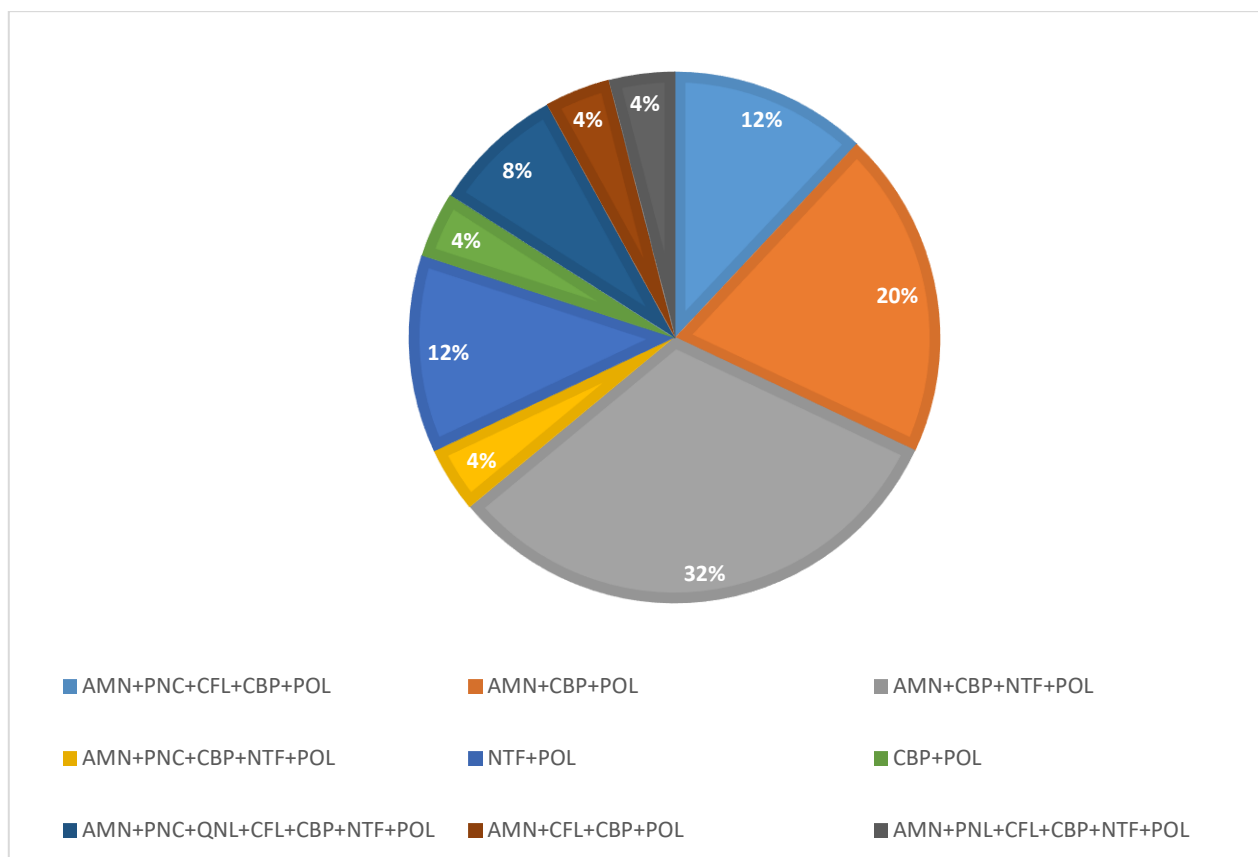


Gráfico 02: Porcentagem de cepas com grupo de resistência - Aminoglicosídeos (AMN), Penicilina (PNC), Quinolonas (QNL), Cefalosporina (CFL), Carbapenemas (CBP), Nitrofurantoína (NTF), Polimixinas (POL)

Ao contextualizarmos o aspecto da resistência aos antimicrobianos, nota-se um aumento desse fator ao longo dos anos, o que explica o cenário atual, sendo corriqueiro deparar com a alta prevalência de cepas multirresistentes aos principais grupos farmacológicos utilizados na saúde humana e animal (Onuma, 2017).

A resistência de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos, segundo dados do Ministério da Saúde na década de 70 era aproximadamente de 17%, porém ao final dos anos 80 esses percentuais subiram para 31% incluindo a resistência às fluoroquinolonas. Tal fato vem culminando, neste século, com o aparecimento, em diferentes países, de cepas produtoras de diferentes tipos de beta-lactamases. A incidência de resistência bacteriana a antimicrobianos representa risco à saúde humana e animal (Brasil, 2001c).

O crescente isolamento de bactérias multirresistentes pode ser explicado pelo uso indiscriminado dos antibióticos tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, Onuma (2017), afirma que práticas como prescrições de antimicrobianos desnecessárias, ou com dosagem ou duração incorreta para tratamento na medicina humana. Bem como o uso de antibióticos em animais

que servem de alimentos aos humanos, tende a contribuir para o surgimento de bactérias multirresistentes, em especial as bactérias *Salmonella* spp.

É crescente a preocupação da comunidade científica mundial com a segurança alimentar, especialmente no que se refere ao uso de medicamentos antibióticos em rações para animais. A possibilidade do surgimento de cepas bacterianas resistentes devido ao mal-uso dos antimicrobianos, assim como a ocorrência de resíduos de medicamentos em produtos de origem animal têm motivado alternativas para o uso consciente dos antibióticos sem que o desempenho zootécnico ou a salubridade do alimento sejam comprometidos (Santos et al., 2016).

Silva et al (2014), avaliando a sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp previamente isoladas de amostras de carne de frango verificaram resistência à poliximina B e eritromicina em 16 (94,1%) do total de cepas isoladas. Outras 10 cepas (58,8%) apresentaram resistência à sulfonamida e penicilina G sendo que todas as cepas analisadas apresentaram multirresistência frente aos antibióticos testados. Através da análise dos dados conclui-se que a ocorrência de cepas multirresistentes não é um fato raro, o que salienta a necessidade de um controle no uso de antimicrobianos na medicina veterinária.

O uso de antibiótico de forma indiscriminada também foi abordado por Greeson et al. (2013) ressaltando que essa prática, além de fornecer risco à população pela sua presença no alimento, pode levar a seleção de linhagens bacterianas resistentes aos diferentes princípios ativos, dificultando o tratamento de infecções, tanto em humanos como nos animais. O risco do uso de antibiótico de forma indiscriminada gera, um cenário preocupante para o ramo de produção de proteína animal, uma vez que, essa em sua grande maioria são um dos principais fatores colaborativos para o surgimento de resistência microbiana.

Conclusões

Visualizando o perfil sanitário dos estabelecimentos utilizados para esse experimento, conclui-se que é necessário uma atuação fiscalizatória ainda mais efetiva, seja ela nas indústrias primárias de beneficiamento de frango, bem como na comercialização nos estabelecimentos varejistas, uma vez que os inúmeros fatores sanitários se aplicam a todas as fases do processo de beneficiamento, armazenamento e comercialização sendo de fundamental importância o cuidado quanto a inocuidade do alimento ofertada ao consumidor.

Embora o trabalho apresente a ausência de isolamento de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, ao encontramos a presença de outros genovares desse agente, desperta a real preocupação quando nos referimos a presença desse agente em alimentos. Mesmo os outros genovares apresentando pouca relação com os casos de salmonelose em humanos, a persistência desses agentes não deixa de ser um fator de preocupação para a saúde pública, cabendo uma revisão na legislação atual, considerando o aumento da vigilância para outros genovares potencialmente patogênicos.

Quando se trata de *Salmonella* spp, embora saibamos que a maior parte da contaminação desse agente é de origem industrial ou até mesmo do campo, nota-se que o processo de manipulação pode propagar tal agente para os estabelecimentos processadores desses produtos, sendo esse uma importante fonte para um possível surto.

A resistência aos grupos de antibióticos testados, se faz uma preocupação de extrema importância uma vez que esse cenário atual acarreta grandes prejuízos tanto para saúde pública como aparecimento de cepas cada vez mais resistentes, bem como para a saúde animal uma vez que os animais também são vítimas dessa resistência, inviabilizando o tratamento a campo dessa enfermidade gerando prejuízos para a produção avícola.

Referências

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica Salmonella CRISC, Brasília, 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/entenda-melhor-salmonela-em-carne-de-frango.pdf>> Acesso em: 19 jun 2018.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmitidas por Alimentos. Apresentação surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos do ano de 2007 a 2017a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao_dta.pdf. > Acesso em: 04 jul 2018.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Técnico de diagnóstico laboratorial da Salmonella spp., Brasília, 2001c. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf. > Acesso em: 24 jan 2018.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório do Monitoramento da Prevalência e do Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas Isolados de Carcaças de Frangos Congeladas Comercializadas no Brasil (PREBAF). Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395481/Relat%C3%B3rio+Prebaf.pdf>. <Acesso em: 23 de setembro 2018.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. resolução RDC nº 12/2001: aprovar o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. diário oficial da união, 02 jan, 2001a.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 13/2001: 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, 02 jan, 2001b.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 70, 10 de outubro de 2003. Dispõe sobre os Programa de redução de patógenos- monitoramento microbiológico - controle de Salmonella sp. em carcaças de frangos e perus. Diário Oficial da União, Brasília, 10 out. 2003 Seção 1, p. 9.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 20, 21 de outubro de 2016. Estabelece o controle e o monitoramento de Salmonella spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor, na forma desta Instrução Normativa e dos seus Anexos I a IV. Diário Oficial da União, Brasília, 25 out. 2016 Seção 1, p. 13.

Brasil. Ministério da Saúde. Nota Informativa nº 192-SEI/2017-CGDT/DEVIT/SVS/MS e Sistema Informação de Agravos de Notificação (Sinan). 13 de dezembro de 2017b. Comunicação Pessoal.

CLSI/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 3rd ed. v.23, n.1, substitui a Norma M2-A7 Vol. 20 No. 1 p.1-58, 2018.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Central de inteligência de aves e suínos, estatística/mundo/frango de corte [on line], 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>. Acesso em: 16 de setembro de 2018.

Greeson, K.; Suliman, G.M.; Sami, A.; Alowaimer, A.; Koohmaraie, M. Frequency of antibiotic resistant *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, and *Staphylococcus aureus* in meat in Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology*.

International Organization For Standardization. ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4th ed. Geneva, 2002.

Kich, J. D.; Cardoso, M. Salomelose In: Sobestiansky, Y.; Barcellos, D., Doenças dos suínos. Goiânia: Canône Editorial. Bacterioses. p.257-264 2012.

Lázaro, N.S.; Reis, E.M.F.; Pereira, C.S.; Rodrigues, D.P. Gênero *Salmonella*: características epidemiológicas e laboratoriais [online], 2008. Disponível em: http://bvs.panalimentos.org/local/file/Inclusiones2008/2GSS_Curso_Capacitacao_Nivel3_Brasilia2008_estanaBVS/GSS_2008_pdf/Manual%20Salmonella%20GSS%202008%20doc.pdf. Acesso em: 22 de jul de 2018.

Levinger, B. School feeding, school reform, and food security: connecting the dots. *Food Nutrition Bulletin*, v.26, p.170-178, 2005.

Monte ALS, Gonsalves HRO, Villarroel ABS, Damaceno MN, Cavalcante ABD. Qualidade da carne de caprinos e ovinos: uma revisão. *Agrop Cient Seminário*.2012;8(3):11-7.

Moraes, D.M.C.; Andrade, M.A.; Rezende, C.S.M.; Barnabé, A.C.S.; Jayme, V.S.; Nunes, I.A.; Batista, D.A. Fontes de infecção e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. isoladas no fluxo de produção de frangos de corte. *Animal Pathology / Scientific Article Arquivo Instituto Biológico, São Paulo*, v.81, n.3, p. 195-201, 2014.

Oliveira, A. P.; Sola, M.C.; Feistel, J.C.; Rezende, C.S.M; Fayad, A. R. *Salmonella* sp. e o abate de frangos: pontos críticos de controle. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.14; p. 8 6 5, 2012.

Oliveira, A.A.; Andrade, M.A.; Armendaris, P.M.; Bueno, P.H. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. *Ciência animal brasileira*, Goiânia, v.17, n.1, p. 79-89 jan./mar. 2016

Olsvick, O.; Strockbine, N.A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga- like toxin genes in *Escherichia coli*. In: Persing, D.H.; Smith, T.F.; Tenover, F.C.; White, T.J. *Diagnostic molecular microbiology principles and applications*, p.271-276. Londres: ASM Press, 1993.

Onuma, D., Bactérias multirresistentes na atualidade. [On line]. Disponível em: <http://www.saude.pa.gov.br/wp-content/uploads/2017/06/Bacterias-MDR-na-atualidade.pdf>. Acesso em: 16 de setembro de 2018.

Pereira, F.C.S.; Abreu, R.S.; Ferreira, E.G. Pesquisa de *Escherichia coli* no churrasquinho de carne comercializado no centro de Macapá. *Revista Eletrônica Estácio Saúde*, Santa Catarina, v.5, n.2, 2016.

Santos, A.V.; Fialho, E.T.; Zangerônimo, M.G.; Cantarelli, V.S.; Teofilo, T.S.; Molino, J.P. Aditivos antibiótico, probiótico e prebiótico em rações para leitões desmamados precocemente. *Revista Ciência animal brasileira*, Goiânia, v.17, n.1, p. 1-10 jan./mar. 2016.

Silva, C.J., Tejada, T.S.; Timm, C.D. Resistência de *Salmonella* isoladas de humanos e de frangos a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* (v.8, n.4) p. 120 – 131 out - dez (2014).

Soumet, C., Ermel, G., Rose, V. *et al.* (1997) Simultaneous detection by PCR of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis from environmental samples of poultry houses. In *Salmonella and Salmonellosis Proceedings* ed. Colin, P., Le Goux, J.M. and Clement, G. pp. 53–57. Ploufragan, France: ISPAIA.

The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) — Food and Feed Safety Alerts. Available from: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>. Accessed 15 November 2017

União brasileira de avicultura – UBABEF, Relatório Anual 2010/2011 [online], 2013. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>. Acesso em 30 de janeiro de 2014.

Wattiau P., Van Hesse M., Schlicker C., Vander Veken H., Imberechts H. Comparison of Classical Serotyping and PremiTest Assay for Routine Identification of Common *Salmonella enterica* Serovars. *J. Clin. Microbiol.*, 2008; 46, pp. 4037 – 4040.

Zhao, S.; Mcdermott, P.F.; White, D.G.; Qiayumi, S.; Friedman, S.L.; Abboy, J.W.; Glenn, A.; Ayers, S.L.; Post, K.W.; Fales, W.H.; Wilson, R.B.; Reggiardo, C.; Walker, R.D. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. *Veterinary microbiology*. Amsterdam, v. 123, p.122-132, 2007.

Zundt M, Firetti R, Martins TR, Cardoso DT, Angelo BA, Rego FCA, et al. Qualidade microbiológica e química da carne de ovinos de duas diferentes procedências comercializada em Presidente Prudente – SP. *Coll Agrariae*.2014;10(2):75-83.

.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PATOTIPOS DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS EM CARNES DE FRANGO TEMPERADO COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE RIO VERDE, GOIÁS

Flávio Barbosa da Silva^{1*}; *Iderval da Silva Júnior Sobrinho*²; *Marcia Dias*³; *Cecília Nunes Moreira*⁴.

¹ Pós-graduandos do curso de Biociência animal, Universidade Federal de Goiás REJ. flaviorcc2009@hotmail.com*

² Professor Adjunto do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal Goiás, Regional Jataí-GO, Brasil

³ Professora Associada do curso de Zootecnia da Universidade Federal Goiás, Regional Jataí, -GO, Brasil

⁴ Professora Associada do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Goiás, Regional Jataí, -GO, Brasil.

Resumo

Os agentes biológicos mais comumente citados nos casos de Doenças veiculadas a alimentos são bactérias, e dentre elas a *Escherichia coli*. Presença de *E. coli* em um alimento é um dado muito importante, pois é um indicador de contaminação fecal e deve ser analisada com cautela, pois a espécie pode compreender cepas patogênicas, comumente envolvidas em surtos de DVA. Com isso, propomos com esse trabalho, avaliar a qualidade microbiológica da carne de frango temperado comercializada no município de Rio Verde, Goiás, visto a escassez de trabalhos abordando esse tipo de matriz analítica, uma vez que essa, pode ser veiculadora de importantes patógenos, devido à grande preferência por parte dos consumidores para esse tipo de proteína processada, utilizando como microrganismos indicadores *Escherichia coli*, apontando possível resistência a antibióticos bem como a caracterização molecular de 5 patótipos diarreiogênicos (*E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC). Foram confirmadas a presença de *E. coli*, em 44 amostras, correspondendo a 55% das amostras analisadas. Quanto a resistência antimicrobiana, 59% (26/44) foram consideradas multirresistentes, 23% (10/44) resistentes e apenas 18% (8/44) foram sensíveis aos antimicrobianos analisados. Entretanto nenhum dos patótipos pesquisados foi encontrado. Embora não tenha sido confirmado a presença de patótipos diarreiogênicos cabe ressaltar que a presença de 55% de positividade para *E. coli* é um dado importante e que deve ser acompanhado de perto pelos órgãos fiscalizadores na tentativa de fornecer alimento seguro para o consumidor.

Palavras-chave: saúde pública, segurança alimentar, vigilância sanitária.

1 Introdução

Alimento seguro é aquele em que os contaminantes estejam ausentes ou abaixo dos limites máximos indicados pela legislação. Práticas como, uso de matérias primas contaminadas e a falta de higiene, desde o abate até a armazenagem e comercialização dos alimentos, são fatores que implicam riscos aos consumidores (Pereira, 2016).

A carne de frango pode veicular patógenos já que sua base proteica é naturalmente nutritiva para os microrganismos. Eles abrigam e se proliferam devido a fatores extrínsecos como a contaminação durante o abate e fatores intrínsecos como o pH favorável (Velho et al., 2015).

Pesquisa feita com 2.869 famílias brasileiras, relata que o consumo da carne de frango está presente em grande parte dos domicílios. Um total de 85% das famílias definiu a carne de frango como saudável e 58% consomem a carne de duas a três vezes por semana. O consumo frequente desse produto reporta a necessidade da qualidade microbiológica do mesmo (UBABEF, 2012).

Escherichia coli é predominante na microbiota intestinal de animais de sangue quente e a maioria das cepas são comensais, porém esse grupo apresenta cepas patogênicas, que podem causar gastroenterite graves ou acometer outros órgãos (Huang et al., 2006; Gordon, 2010). Os patótipos de *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC) são constituídos por cepas que apresentam mecanismos diversificados de virulência, que permite identificá-las e classificá-las em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *Escherichia. coli* de aderência difusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998; Hu & Torres, 2015).

A presença de *E. coli* em um alimento é um dado muito importante, pois é um indicador de contaminação fecal do produto e deve ser analisada com cautela, pois além de indicador, a espécie pode compreender cepas patogênicas, comumente envolvidas em surtos de DVA (Meng, 2007).

A exposição da população a esses riscos retrata a necessidade de ações frequentes e efetivas de vigilância sanitária. Com isso, propomos com esse trabalho, avaliar a qualidade microbiologia da carne de frango temperado, comercializada no município de Rio Verde, Goiás, utilizando como microrganismos indicadores *Escherichia coli*, objetivando caracterizar a presença de cepas diarreiogênicas, e a possível resistência a antibióticos.

2. Materiais e método

Foram avaliadas 80 amostras de carne de frango temperado de 40 estabelecimentos comerciais escolhidos de forma por meio de uma listagem contendo todos os estabelecimentos que comercializam produtos de origem animal na cidade, sendo essa composta por um total de 60 estabelecimentos, os quais foram sorteados de forma aleatória e classificados como supermercados e casa de carne, sendo visitados semanalmente 10 estabelecimentos de cada região. As coletas foram realizadas em duas etapas e o experimento foi realizado no Laboratório de Práticas Veterinárias e no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Jataí (UFJ).

As amostras foram adquiridas por meio de compra sendo analisada uma porção de 200 gramas, conforme estabelecido ANVISA (RDC 12), sendo todas dispostas para compra na forma a granel. Para a identificação adequada das amostras, no momento da aquisição dos alimentos, foi preenchido um formulário com descrição da data, hora da coleta, tipo de corte, rotulagem e origem (Anexo 1). Não foi aplicado questionário e foi mantido o absoluto sigilo sobre a identidade dos estabelecimentos.

As amostras foram processadas pelo isolamento bacteriano convencional segundo a Instrução Normativa nº 62 do ano de 2003 (Brasil, 2003), estipulada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento (MAPA), e as amostras confirmadas como *Escherichia coli* foram armazenadas em agar conservação e mantidas sob temperatura de congelamento e enviadas para identificação genotípica pela técnica de PCR convencional, a fim de caracterizar os patotipos diarreiogênicos *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC).

A extração de DNA de cada colônia foi realizada pelo método da fervura segundo Olsvick & Strockbine (1993) e a qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em uma reação contendo água ultrapura, tampão 10x, MgCl₂(25mM), dNTP (1mM cada), BSA (1 mg/ml), primer (6 µM) de cada, Taq DNA polimerase (5 U/ µl), DNA *Escherichia coli* (2 µl). Os ciclos de amplificação foram realizados seguindo o padrão de aquecimento empregados no termociclador iniciando a 94°C por 3min, seguindo para o protocolo de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 63°C por 30 s e 72°C por 1 min. A reação foi finalizada a 72°C por 10 min para a extensão final e manutenção a 4°C por tempo indeterminado até a retirada da reação do termociclador.

Com o intuito de otimizar o protocolo de amplificação, as amostras individuais de DNA foram agrupadas em conjuntos de cinco indivíduos. Cada conjunto de DNA foi amplificado individualmente em duas PCRs independentes, cada qual com seu conjunto específico de primers (STX1_{forward} +

STX1reverse; STX2forward + STX2reverse; STHforward + STHreverse; LTforward + LTreverse e eaeAforward + eaeAreverse + ipaAforward e ipaAreverse). A qualidade da PCR e os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando um marcador de tamanho molecular como referência (Ladder 1 kb – Invitrogen). As sequências nucleotídicas dos primers (sequência 5' → 3') utilizados na amplificação dos genes de virulência foram obtidas de OH, et al, 2014 com modificações (Quadro 01).

Quadro 1: Sequência gênica dos primers utilizados para caracterizar os patótipos diarreioogênicos *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC).

Patótipo	Gene	FORWARD	REVERSE	pb	NCBI
STEC	STX2	TACCACTCTGCAACGTGTCG	CGATACTCCGGAAGCACATT	637	AB609719
STEC	STX1	CGTCTTTACTGATGATTGATAGTGGC	ACCTACAGGGCACAATAAC	297	CP007529
ETEC	STH	TTCGCTCAGGATGCTAAACCA	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	167	FN822745
ETEC	LT	GTACTTCGATAGAGGAACAAATGAATAT	ATTCTGGGTCTCCTCATTACAAGTATC	530	LN870273
EPEC	eaeA	CGGCGATTACGCGAAAGA	CCTAAATTTGCCGTAAAG GG	248	AAF043226
EIEC	ipaA	CCTTTTCCGCGTTCCTTGA	CAGCAGCAACAGCGAAAGAC	104	KT248235

Os isolados de *Escherichia coli* foram testados quanto à sensibilidade a antimicrobianos, pelo teste de difusão em ágar Mueller-Hinton (Oxoid®), realizado e interpretado de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (CLSI, 2018).

Doze antimicrobianos foram selecionados, representando sete diferentes grupos farmacológicos, disponíveis em discos impregnados comerciais (Sensidisc®): aminoglicosídeos – ampicilina 30 µg (AMI) e gentamicina 10 µg (GEN); carbapenemas – imipenem 10 µg (IPM); cefalosporinas – cefepime 30 µg (CPM) e cefotaxima 30 µg (CTX); nitrofurantoína – nitrofurantoína 300 µg (NIT); penicilinas – ampicilina 10 µg (AMP); polimixinas - polimixina B 300 µg (POL); quinolonas – ácido nalidíxico 30 µg (NAL), ciprofloxacina 05 µg (CIP) e norfloxacina 10 µg (NOR).

A análise da resistência aos antibióticos foi dada a partir da classificação de desempenho das cepas a seis diferentes grupos farmacológicos aminoglicosídeos (AMN), penicilina (PNC), quinolonas (QNL), carbapenemas (CBP), nitrofurantoína (NTF), polimixinas (POL).

Classificando as cepas, em três grupos: Multirresistentes (cepas resistentes a mais de três grupos), Resistentes (cepas resistentes até dois grupos) e sensíveis (cepas que apresentam sensibilidade a qualquer um dos grupos).

Os dados foram computados no programa Sistema de Análises Estatísticas – SAS v. 9.3 (2010) a 5% de probabilidade. Foi usado o qui-quadrado de Mantel-Haenzsel para tendência linear e "razão de chances" (OR), para avaliar os prováveis fatores de risco ambientais e de manuseio, na prevalência de *E. coli*.

Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão específica de agências de fomento no setor público, comercial ou setores sem fins lucrativos.

3 Resultados e Discussão

Após avaliação microbiológica conforme descrito na IN n° 62 (Brasil, 2003), foi possível mensurar e caracterizar que 55% (44/80) de amostras foram positivas para *Escherichia coli*.

A determinação de níveis altos da presença desse agente em alimentos reforça as informações destacadas pelo Ministério da Saúde reportada no ano de 2017. Ao avaliar a epidemiologia dos surtos de DVA durante os anos de 2007 a 2017, observou-se a liderança desse agente no *ranking* dos casos de surtos envolvendo *E. coli* totalizando um número de 525 casos em um total de 7.170 (BRASIL, 2017).

A presença de *E. coli* no produto final desperta a preocupação de possíveis falhas no controle desse agente, desde sua criação até as plantas frigoríficas e, por conseguinte ao consumidor final. Caldorin, (2013); seguido de Trung et al., (2016) reportam a importância de *E. coli* em alimentos ao descrever que esse agente é um indicador de contaminação fecal, por estar na microbiota das aves e outros animais. Logo, falhas no abate e manipulação podem contaminar os alimentos durante todo o processamento até a mesa do consumidor.

Ao consideramos os aspectos sanitários envolvendo a presença de *E. coli* em planteis de aves, trazemos à tona uma importante perspectiva de controle desse agente no produto final. Dinev (2014) afirma que a infecção de aves por *E. coli* pode ocorrer em distintas fases da criação desencadeando problemas sanitários graves, impactando diretamente na qualidade do produto ofertada ao frigorífico. Corroborando Machado et al. (2013) relatam que a colibacilose é uma das principais causas de perdas econômicas na produção avícola, seja pelos gastos com tratamento e profilaxia ou mesmo com a perda nas unidades frigoríficas.

A portaria de n° 210 do ano de 1998 estabelecida pelo Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento considera que lesões que envolvem pericardite, perihepatite e aerossaculite são lesões normalmente ocasionadas por *E. coli* sendo estas lesões classificadas como a tríade de condenação de carcaças por colibacilose (Ferreira & Knobl, 2000; Maciel, 2016).

A condenação de carcaças com lesões características de colibacilose é de fato uma importante ferramenta de inspeção utilizada nas indústrias, entretanto, a contaminação de “carcaças sadias” por sua vez é uma realidade constante nas plantas frigoríficas, sendo essas muitas vezes relacionadas com tecnopatias e ineficiência nos sistemas de evisceração.

Oliveira (2012) ressalta que o contato com superfícies contaminadas, bem como as próprias mãos dos manipuladores e a contaminação cruzada durante o preparo dos alimentos são fatores de grande impacto na contaminação de produtos avícolas destinados ao consumo humano.

Avaliando as causas de contaminação de carcaças em frigoríficos, Alonso et al. (2012) relatam que o processo de evisceração ineficaz aliado a presença de ruptura do intestino, é considerado um ponto crítico de controle no abate de aves, sendo esse atribuído a contaminação cruzada durante as fases de abate bem como nas fases de manipulação dentro das indústrias de abate.

Dados apresentados por Oliveira (2012) ao realizar um levantamento epidemiológico para caracterizar as principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal no período compreendido entre 2006 e 2011, observaram que entre as causas destacam-se como principais causas de condenação as contaminações (1,80%), seguidos de contusão/lesão traumática (1,57%), dermatose (0,74%) e celulite (0,50%).

A contaminação das carcaças pode ser explicada pelo fato do intenso processo de manipulação das mesmas. Considerando que as amostras estudadas sofreram dois processos de manipulação, desde seu beneficiamento original, como também uma segunda manipulação no estabelecimento de comércio final, aumentado assim o risco de contaminação o que pode ter refletido nos resultados encontrados.

Quanto a resistência antimicrobiana, 59% (26/44) foram consideradas multirresistentes, 23% (10/44) resistentes e apenas 18% (8/44) foram sensíveis aos antimicrobianos analisados.

Apurando os dados foi possível representar de forma gráfica quais grupos obtiveram maior resistência (Figura 01).

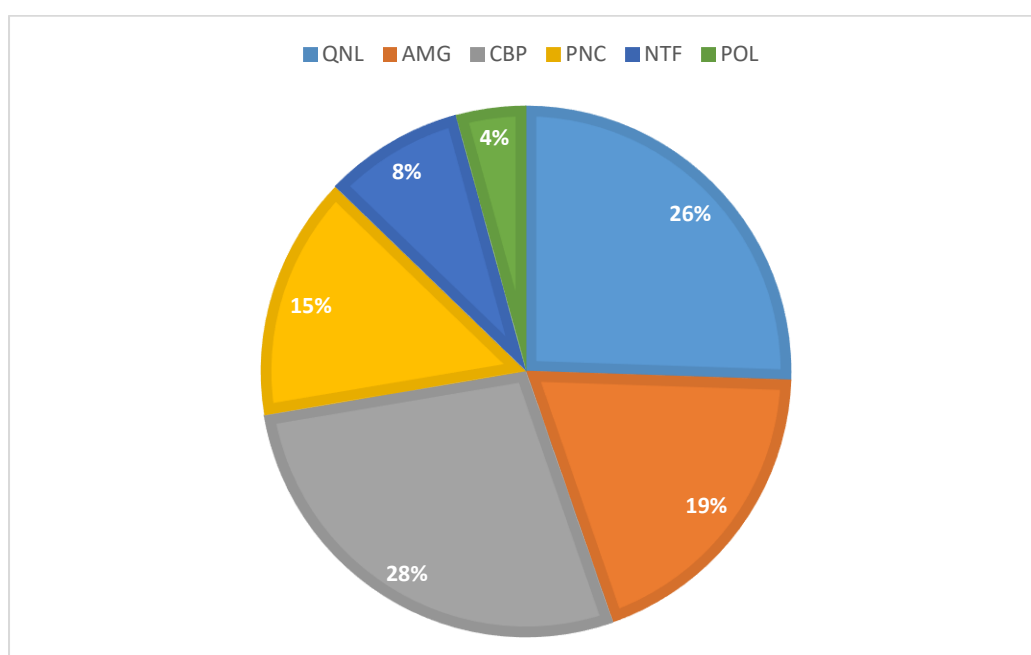


Figura 2 Quantidade de cepas resistentes a cada grupo farmacológico testado aminoglicosídeos (AMN), penicilina (PNC), quinolonas (QNL), carbapenemas (CBP), nitrofurantoína (NTF), polimixinas (POL).

Bactérias multirresistentes estão presentes nas mais diversas fontes, porém o maior risco de contaminação por essas cepas ocorre a partir da ingestão de água e/ou alimentos principalmente os de origem animal (Prió et al., 2006).

Casos de cepas resistentes aos principais antimicrobianos utilizados tem sido relatado por diversos autores, a ação ineficiente dos diversos antimicrobianos sobre *E. coli* foi descrita por Zanata et al., (2004) ao avaliar a presença de cepas de *E. coli* em carcaças de aves comerciais obteve uma prevalência de (77,5%) de cepas com resistência a antimicrobianos. Abordando essa problemática para os produtos destinados ao consumo humano Almeida (2014), ao avaliar ovos de patos comercializados em Goiânia, Goiás verificou que 95,8% (93/97) dos isolados de *E. coli* foram resistentes a pelo menos um tipo de antimicrobiano e em 91,7% (89/97) ocorreu sensibilidade intermediária.

Na avicultura, os antimicrobianos, além de serem utilizados para o tratamento de doenças, estes são usados como promotores de crescimento auxiliando no aumento do desempenho zootécnico e na produtividade das aves (Kuritza et al., 2014). Blaak et al. (2015) afirmam que o uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento de doenças tanto em humanos quanto em animais contribuiu para o aumento do surgimento de bactérias resistentes.

Giguère et al. (2010) mencionam que no Brasil desde o ano de 1998 proíbe uso de antibióticos como aditivos moderadores de crescimento nas rações de animais de produção, porém ainda é comum encontramos níveis alarmantes de resistência nos produtos de origem animal.

O uso de antibiótico de forma indiscriminada foi abordado por Greeson et al. (2013) ressaltando que essa prática, além de fornecer risco à população pela sua presença no alimento, pode levar a seleção de linhagens bacterianas resistentes aos diferentes princípios ativos, dificultando o tratamento de infecções, tanto em humanos como nos animais. Outro problema relacionado ao uso excessivo de antimicrobianos é a contaminação do meio ambiente, sendo estas substâncias disseminadas no solo e nas águas superficiais (Kummerer, 2004).

Embora não se tenha uma restrição legal quanto a presença de *E. coli* em carne de frango, muito menos a seus patótipos, vale considerar que mesmo que alguns dos representantes desse grupo sejam em sua maioria comensais e não apresentem patogenicidade a seus hospedeiros, corre-se o risco de dentre esses exemplares nos depararmos com alguns de importância considerável para a saúde pública como por exemplo a *E. coli* O 157:H7.

Sendo assim no intuito de elucidar e confirmar a presença dos principais patótipos de *E. coli* nas amostras utilizadas nessa pesquisa, foram submetidas a caracterização molecular, todas as 44

amostras positivas para o agente *E. coli*. Para isso as amostras após sua identificação e confirmação bioquímica, foram enviadas para o Laboratório de genética da Universidade Federal de Jataí, onde as mesmas foram submetidas à técnica de PCR convencional. A fim de caracterizar os patotipos diarreio gênicos *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC). Entretanto ao serem submetidas a análise molecular, não houve confirmação de nenhum dos patotipos em questão (Figura 2, 3, 4, 5).

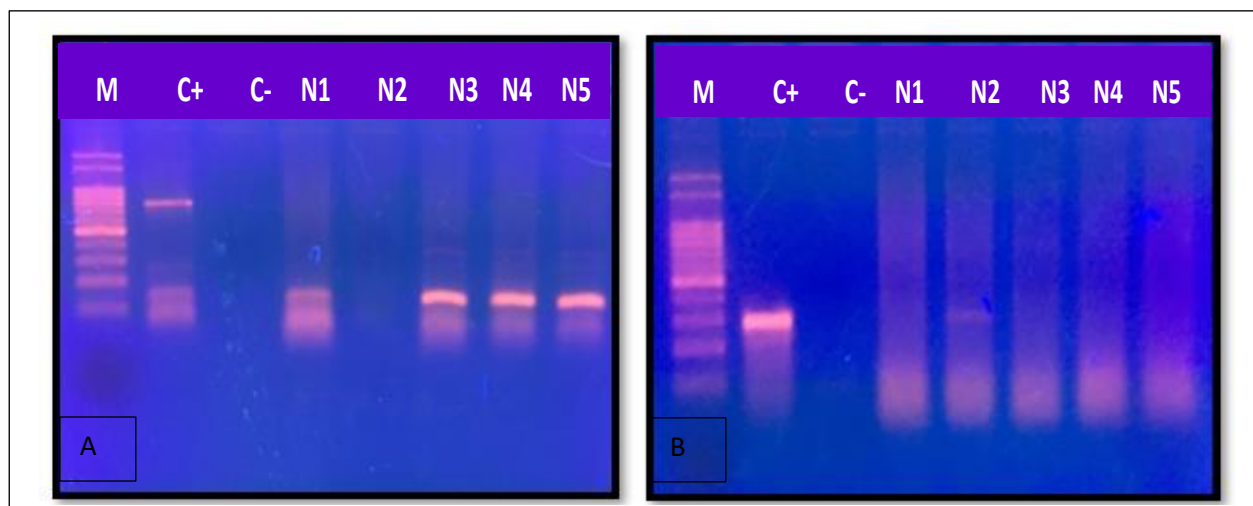


Figura 2: (A) Produtos de PCR da amplificação dos genes *stx2* (STEC) de *Escherichia coli*, de 637pb. Não foram identificadas amostras positivas – N1, N2, N3, N4 N5: Pool de amostras. C+: cepa padrão de *E. coli*. M: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen) CN: controle negativo (mix sem DNA).; **(B)** Produtos de PCR da amplificação dos genes *stx1* (STEC) de *E. coli*, de 297pb. Não foram identificadas amostras positivas – N1, N2, N3, N4 N5: Pool de amostras. C+: cepa padrão de *E. coli*. M: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). C-: controle negativo (mix sem DNA).

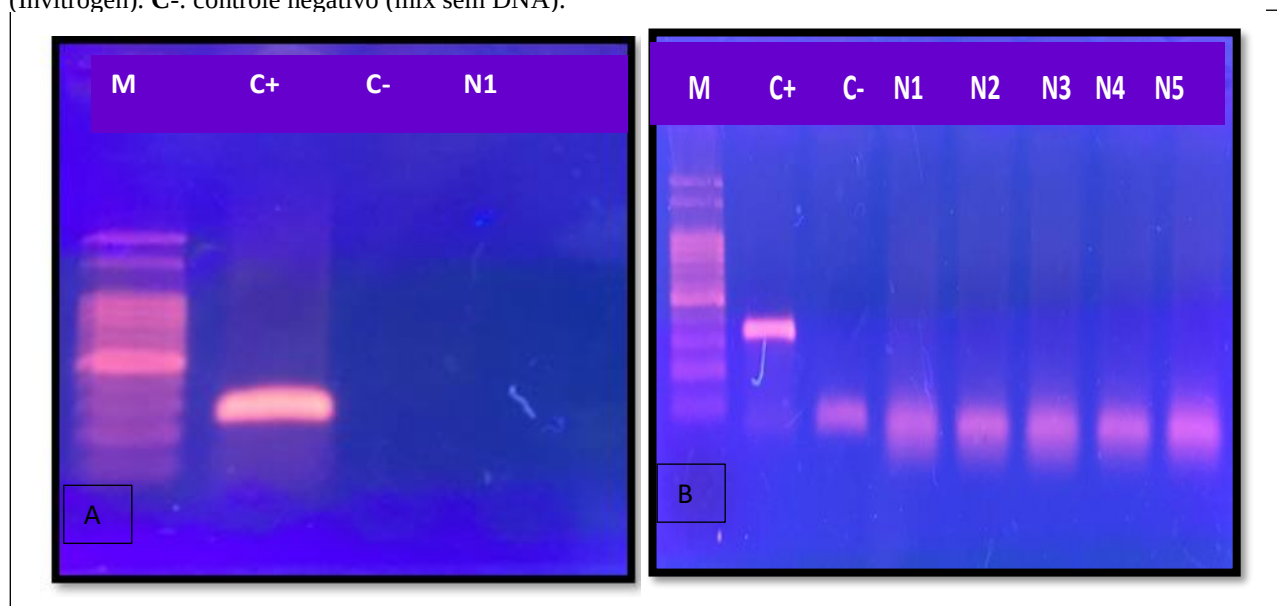


Figura 3: (A) Produtos de PCR da amplificação dos genes *eaeA* (EPEC) de *E. coli*, de 248pb. Não foram identificadas amostras positivas – N1: Pool de amostras. C+: cepa padrão de *E. coli*. M: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen) CN: controle negativo (mix sem DNA).; **(B)** Produtos de PCR da amplificação dos genes *bfpA* (EPEC) de *E. coli*, de 400 pb. Não foram identificadas amostras positivas – N1, N2, N3, N4 N5: Pool de amostras. C+: cepa padrão de *E. coli*. M: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). C-: controle negativo (mix sem DNA).

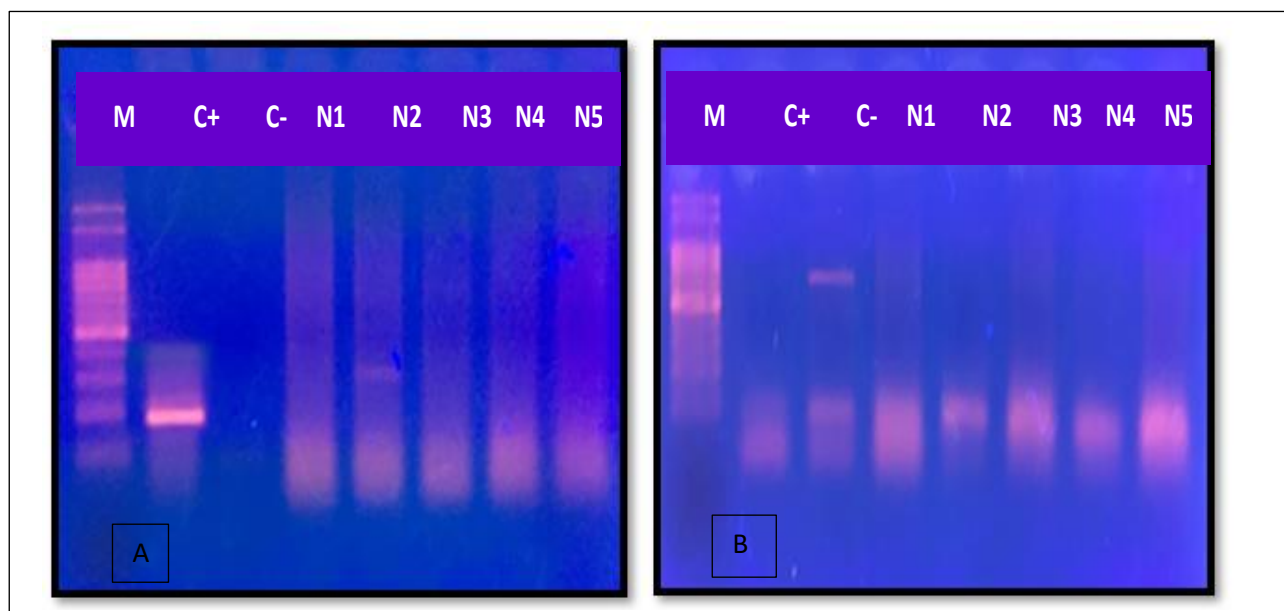


Figura 4: (A) Produtos de PCR da amplificação dos genes Sth (ETEC) de *E. coli*, de 167pb. Não foram identificadas amostras positivas – **N1, N2, N3, N4 N5**: Pool de amostras. **C+**: cepa padrão de *E. coli*. **M**: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen) **CN**: controle negativo (mix sem DNA).; **(B)** Produtos de PCR da amplificação dos genes LT (ETEC) de *E. coli*, de 530 pb. Não foram identificadas amostras positivas – **N1, N2, N3, N4 N5**: Pool de amostras. **C+**: cepa padrão de *E. coli*. **M**: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). **C-**: controle negativo (mix sem DNA).

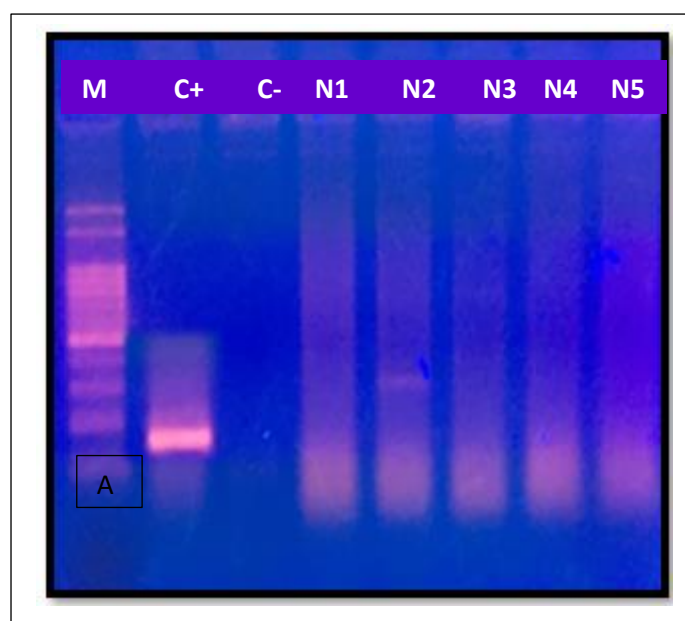


Figura 5: (A) Produtos de PCR da amplificação do gene ipaA (EIEC) de *E. coli*, de 104pb. Não foram identificadas amostras positivas – **N1, N2, N3, N4 N5**: Pool de amostras. **C+**: cepa padrão de *E. coli*. **M**: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen) **CN**: controle negativo (mix sem DNA)

Cepas classificadas como STEC obrigatoriamente necessitam conter pelo menos um dos genes de identificação desse grupo (stx1/stx2), já o patótipo EHEC necessita de apresentar três genes de virulência simultaneamente (stx1/stx2/eaeA).

A ausência desses genes pode ser explicada por duas causas principais. Analisando os relatos bibliográficos percebemos que não é comum encontrar os genes (stx1/stx2/eaeA) em aves. Costa et

al., (2010) ao avaliar 138 coxas de frango comercializadas na capital de São Paulo não detectaram a presença de cepas diarreiogênicas. Em análise mais complexa avaliando todas as fases de produção de aves Casagrande, (2016) ao analisar a presença *E. coli* diarreiogênica em granjas, frigoríficos e cortes de frangos congelados adquiridos em supermercados, conseguiu isolar apenas 4 amostras positivas para STEC, sendo as demais amostras negativas para esse gene.

Esse resultado pode ser explicado por Gyles, 2007, que determina como portador natural e assintomático de EHEC e STEC apenas os suínos e os bovinos. Como nos supermercados ocorre manipulação desses três tipos de proteínas sugere-se que as STEC encontradas nas amostras de Casagrande, (2016) tenha sua origem as superfícies contaminadas nos supermercados, uma vez que, ao se realizar a triagem de toda a cadeia produtiva das aves não foi possível encontrar EHEC e STEC, apontando uma possível contaminação cruzada.

Para a identificação do patótipo EPEC, é necessário a presença do gene *eaeA* e do gene *bfpA*. Esse patótipo é um importante promotor de patogenia nas aves, e está relacionada a lesões intestinais do tipo A/E “*attachment and effacing*” (fixação e esfacelamento), a qual lesiona os enterócitos promovendo a dispersão sistêmica do agente causando lesões em diferentes órgãos como sacos aéreos, coração e fígado, sendo esse patótipo facilmente encontrado em vísceras (Coura et al., 2014). A ausência de avaliação de vísceras como coração, moela e fígado pode ser uma das causas para a ausência de isolamento desse patótipo nas amostras, pois nessa pesquisa avaliamos apenas os cortes.

Maciel (2016), ao avaliar 117 estirpes de *E. coli* (isoladas de sistema respiratório superior, coração e fígado) provenientes dos estados de Goiás, Tocantins, São Paulo e Distrito Federal, condenadas pelo serviço de inspeção federal do Estado do Tocantins por apresentarem lesões sugestivas de colibacilose, aerossaculite, pericardite e perihepatite obteve positividade de 9% (11/117) das quais, 5% (6/117) foram do sistema respiratório superior, seguido por coração com 2% (3/117) e fígado 1% (2/117).

Dados apresentados por Pannuch et al. (2014) corroboram com os citados acima, ao avaliarem um total de 30 amostras de carne (10 bovina, 10 suína, 10 aves) compradas em merc. 45 tailandenses, obtendo positividade em apenas 2 amostras de carne de frango para o patipo EPEC.

Na identificação de cepas pertencentes ao grupo das ETEC utilizamos os genes *sth* e *LT*. Sua colonização ocorre por aderência, principalmente na mucosa do intestino delgado, sem penetrá-la, causando diarreia, suas enterotoxinas, por sua vez, são responsáveis por atuar no tecido intestinal ambas modificam as funções dos enterócitos, aumentando a secreção e diminuindo a absorção de líquidos, sem alterarem morfológicamente as células intestinais (Coura et al., 2014).

Esse tipo de patogenecidade confere uma predominância dessas cepas ao trato gastrointestinal, o que pode explicar os resultados negativos desse agente nas amostras processadas. Entretanto vale ressaltar que os processos de evisceração ineficientes podem contribuir para a dispersão desse e de outros enteropatógenos contribuindo significativamente para a contaminação das carcaças, e esteiras condutoras de cortes de frango (CDC, 2016).

Na identificação do patótipo EIEC consideramos apenas o gene *ipaA* embora esse patótipo possa apresentar outros genes. Os resultados negativos para esses genes assim como o patótipo ETEC deve-se a sua peculiar patogenecidade. EIEC embora seja capaz de causar lesões, permanece de forma restrita ao local lesionado não se estendendo para fora do tecido alvo. Dessa forma a expressão de fatores de virulência na EIEC é considerada relativamente baixa (Moreno et al., 2009; Maciel, 2016).

Conclusões

Identificar a presença de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* na carne de frango temperado comercializado no município de Rio Verde, Goiás, conclui-se que há necessidade de atuação de uma fiscalização efetiva assim como um maior rigor nos quesitos microbiológicos que devem ser melhorados uma vez encontrados amostras fora dos padrões aceitáveis pela legislação.

Sendo um indicador de contaminação fecal a presença de *Escherichia coli* nas amostras estudadas, aponta graves desvios no processo de manipulação desses alimentos. Cabendo maior investigação dos estabelecimentos manipuladores de produtos de origem animal, bem como treinamentos ainda mais eficazes para os colaboradores envolvidos no processo, compreendendo que o processo de manipulação pode propagar tal agente para os estabelecimentos processadores desses produtos, sendo esse uma importante fonte para um possível surto.

A resistência aos grupos de antibióticos testados, é de preocupação relevante uma vez que esse cenário acarreta grandes prejuízos tanto para saúde pública como aparecimento de cepas cada vez mais resistentes bem como para a saúde animal uma vez que os animais também são vítimas dessa resistência inviabilizando o tratamento a campo dessa enfermidade acarretando prejuízos para a produção avícola.

Referencias

- Almeida, A.M.S. Detecção de genes de virulência e suscetibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de ovos de pata (*Cairina moschata*). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal (EVZ))– Universidade Federal de Goiás, 55 f., Goiânia, 2014.
- Alonso, M. Z. et al. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. *Food Control*, v. 23, n. 2, p. 351–355, 2012.
- BlaaK, H; Van Hoek, A.H.; HamidjajA, R. A.; Van Der Plaats, R. Q.; Kerkhof-De Heer, L.; de Roda Husman, A. M.; Schets, F. M. Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment. *PLoS One*, v.10, n.8, p.1-23, 2015.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmitidas por Alimentos. Apresentação surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos do ano de 2007 a 2017. Disponível em: [http:// portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao_dta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao_dta.pdf).> Acesso em: 04 jul 2018.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, 10 jan. 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-37674527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 10 jun 2017.
- Caldorin M, Almeida I.A.Z.C., Peresi JTM, Alves EC. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. *Bol Epidemiol Paul*, v.10, n. 110, p.4-20, 2013.
- Casagrande, M. F.; Schocken-Iturrino, R. P. Quantificação de Enterobactérias e *Clostridium* spp. e detecção molecular de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em pontos da cadeia produtiva de carne de frango. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Júlio de Mesquita UNESP, 93 f. Jaboticabal, 2016.
- Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Food Safety. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/index.html#c>>. Acessado em 26 agosto 2018.
- Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: Annual Report. 20p. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2013-508c.pdf>>. Acessado em: 26 agosto 2018.
- CLSI/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 3rd ed. v.23, n.1, substitui a Norma M2-A7 Vol. 20 No. 1 p.1-58, 2018.
- Costa, A.R.F. et al. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreio gênicas. *Revista Pan- Amazônica de Saúde*, v. 1, n.2, p.77-84, 2010.

- Coura, F. M.; Lage, A. P.; Heinemann, M. B. Patótipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n.9, p.811-818, 2014.
- Dinev, I. Bacterial diseases, *Escherichia coli* infections, 2014. Disponível em: <http://www.thepoultrysite.com>. Acesso em: 24 de agosto de 2018.
- Ferreira, A.J.P.; Knobl, T. Colibacilose. In: Berchieri Jr., A.; Macari, M.: *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA. 2 ed., 2000.
- Giguère, S.; Prescott, J. F.; Baggot, J. D.; Walker, R. D.; Dowling, P. M. *Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária*. 4ed, São Paulo: 1ed. Roca, 2010. 683p.
- Gordon, D.M. Strain typing and the ecological structure of *Escherichia coli*. *Journal of AOAC international*. Canberra, v.9, n.3, p.974–984, 2010.
- Greeson, K.; Suliman, G.M.; Sami, A.; Alowaimier, A.; Koohmaraie, M. Frequency of antibiotic resistant *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, and *Staphylococcus aureus* in meat in Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology*.
- Gyles, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, v.85, p.45-62, 2007.
- Hu, J. & TORRES, A.G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander. *Clinical Microbiology and Infection*. Galveston, v.21, n.8, p.729-34,2015.
- Huang, D. B.; MohantY, A.; Dupont, H. L.; Pkhuysen, P. C.; Chiang, T. A. A review of a emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. Houston, v. 55, p. 1303-1311, 2006.
- Kummerer, K. Resistance in the environment. *Journal Antimicrobiology Chemother*, v. 54, n. 2, p.311-320, 2004.
- Kuritza, L.N.; Westphal, P.; Santin, E. Probióticos na avicultura. *Ciência Rural*, v.44, n.8, p.1457-1465, 2014.
- Machado, L. S. et al. Pcr na detecção de gene *fel a* de *Escherichia coli* em frangos de corte condenados por aerossaculite pela inspeção sanitária federal. *Arquivo Instituto Biológico*, São Paulo, v. 80, n. 2, p. 145-149, 2013.
- Maciel, K.A.; Barbosa, S.M.; Dias, F.E. Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de aves abatidas no estado do Tocantins. Dissertação (Ciência Animal Tropical) - Universidade Federal do Tocantins, 67 f., Araguaína, 2016.
- Meng J.; Doyle M.P.; Zhao T.; Zhao S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Doyle MP, Beuchat LR. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 3. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2007. 249 p.
- Moreno, A.C.R.; Ferreira, L.G.; Martinez, M.B. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how diferente patternsof gene expression. Affect Virulence. *Microbiology Letters*. v.301, p.156–163, 2009.

Nataro JP, Kapper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11: 142-201, 1998.

Oh, K.H.; Kim, S.B.; Park, M.S.; Cho, S.H. Development of a One-Step PCR Assay with Nine Primer Pairs for the Detection of Five Diarrheagenic *Escherichia coli* Types. Jornal Microbiology Biotechnology. (2014), 24(6), 862–868. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1312.12031>.

Oliveira, A. P. Salmonella sp. em frango e ambiente de abate. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal (EVZ)– Universidade Federal de Goiás, 55 f., Goiânia, 2012.

Olsvick, O.; Strockbine, N.A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga- like toxin genes in *Escherichia coli*. In: Persing, D.H.; Smith, T.F.; Tenover, F.C.; White, T.J. Diagnostic molecular microbiology principles and applications, p.271-276. Londres: ASM Press, 1993.

Pannuch, M. et al. Quantification of enteropathogenic *Escherichia coli* from retailed meats. International Food Research Journal, v. 21, n. 2, p. 547-551, 2014.

Pereira, F.C.S.; Abreu, R.S.; Ferreira, E.G. Pesquisa de *Escherichia coli* no churrasquinho de carne comercializado no centro de Macapá. Revista Eletrônica Estácio Saúde, Santa Catarina, v.5, n.2, 2016.

Prió P.; Gasol R.; Soriano R. C.; Perez-rigau A. Effect of raw material microbial contamination over microbiological profile of ground and pelleted feeds. In: Brufan J. (Ed.): From Feed to Food, p.197-199, 2006.

Trung, N. V.; Nhung, H. N.; Carrique-MAS, J. J.; Mai, H. H.; Tuyen, H. T.; Campbell, J.; Nhung, N.T; Minh, P.V; Wagenaar, J.A; Mai, N. T. N; Hieu, T. Q; Schultz, C.; Hoa, N.T. Colonization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in chickens and humans in southern Vietnam. BMC microbiology, v. 16, n. 1, p. 208, 2016.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Carne de frango, unanimidade que vai do Norte ao Sul do Brasil: Revista Avicultura Brasil. São Paulo, v.1, p.8-9, 2012. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/938d713b69d9f25901b1d810f038272b.pdf>>. Acesso em: 11 jun 2018.

Velho, A.L.M.C.S.; Abrantes. M.R.; Medeiros, J.M.S.; Aguiar, K.C.S.; Sousa, Ê.S.; Soares, K.M.P; SILVA, J.B.A. Avaliação quantitativa de Carne Bovina In Natura comercializado em Mossoró-RN. Acta Veterinaria Brasilica. Mossoró, v.9, n.3, p.212-217, 2015.

Zanatta, G. F.; Kanashiro A. M. I.; Castro A. L. S. P.; Cardoso, E. N. C.; Tessari, S. C. P. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. Arquivos Instituto Biológico, São Paulo, v.71, n.1, p. 283-286, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visualizando a presença de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* nos estabelecimentos utilizados para esse experimento, conclui-se que é necessária uma atuação fiscalizatória ainda mais efetiva, seja ela nas indústrias primárias de beneficiamento de frango, bem como na comercialização nos estabelecimentos varejistas.

A resistência aos grupos de antibióticos testados é preocupante, uma vez que esse cenário atual acarreta grandes prejuízos tanto para saúde pública como aparecimento de cepas cada vez mais resistentes, bem como para a saúde animal.

Ainda cabe ressaltar que a utilização e o emprego de ferramentas moleculares deve ser considerado sempre que reportarmos a pesquisas de microrganismos indicadores, pois os mesmos auxiliam na identificação e obtenção de diagnósticos cada vez mais eficazes, permitindo uma maior fidelidade nos dados e consequentemente auxiliando na construção do real cenário epidemiológico do país.