

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA ASPERSÃO DE ÁGUA SOBRE A CONTAMINAÇÃO
MICROBIOLÓGICA EM ESTEIRAS TRANSPORTADORAS DE
CORTES DE FRANGO

VANESSA MENDONÇA SOARES

BOTUCATU – SP
Julho de 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA ASPERSÃO DE ÁGUA SOBRE A CONTAMINAÇÃO
MICROBIOLÓGICA EM ESTEIRAS TRANSPORTADORAS DE
CORTES DE FRANGO

VANESSA MENDONÇA SOARES

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor

Orientador: Prof. José Paes de Almeida
Nogueira Pinto

BOTUCATU – SP
Julho de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Soares, Vanessa Mendonça.

Efeito da aspersão de água sobre a contaminação microbiológica em esteiras transportadoras de cortes de frango / Vanessa Mendonça Soares. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Capes: 50500007

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Frango de corte - Contaminação. 3. Água - Uso. 4. Alimentos - Contaminação. 5. Microorganismos.

Palavras-chave: Carne de aves; Contaminação; Esteiras transportadoras; *Listeria monocytogenes*; Micro-organismos indicadores.

Nome do autor: Vanessa Mendonça Soares

Título: Efeito da aspersão de água sobre a contaminação microbiológica em esteiras transportadoras de cortes de frango

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade Estadual Paulista - Campus Botucatu
Presidente e Orientador

Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot
Departamento de Ciências Veterinárias
Universidade Federal do Paraná - UFPR - Setor Palotina
Membro

Prof. Dr. Luís Augusto Nero
Departamento de Veterinária
Universidade Federal de Viçosa - UFV
Membro

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
Faculdade e Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo - USP
Membro

Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências de Botucatu
Universidade Estadual Paulista - Campus Botucatu
Membro

Data da defesa: 28/07/2014

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Juliano, que em todos os momentos esteve ao meu lado, paciente e amoroso, repleto de palavras de conforto e otimismo, companheiro na vida pessoal e profissional, que sempre me incentivou, aconselhou e auxiliou na realização desta conquista;

Ao nosso filho Lucas, que com sua alegria e ternura trouxe a vitalidade necessária para que pudéssemos seguir em frente da melhor forma possível;

Aos meus pais, Carlos e Vera, por cuidar tão carinhosamente do Lucas nos momentos que precisei, pelo amor dedicado na minha criação e exemplos de honestidade e humildade. Pessoas fundamentais para que eu pudesse atingir meus objetivos de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao querido professor José Paes de Almeida Nogueira Pinto, por sempre acreditar na capacidade do meu trabalho ao longo desses 8 anos de pós-graduação. Mais do que um orientador, que auxiliou no meu crescimento profissional, um grande exemplo de ser humano, pela humildade, ética, generosidade e afetuosidade com o próximo.

Ao professor Luciano dos Santos Bersot, pela sua amizade, ensinamentos e exemplos de ética, seriedade e dedicação à pesquisa e especialmente pela sua generosidade ao ter confiado e proporcionado a oportunidade de desenvolvimento deste trabalho. Minha sincera admiração e gratidão.

À professora Maria Teresa Destro, por toda colaboração com o projeto desde o início e pela sua gentileza ao disponibilizar o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de São Paulo para a realização das análises de biologia molecular deste estudo.

Ao professor Luís Augusto Nero, pela colaboração na correção do trabalho como membro da banca e na sorotipificação das culturas de *L. monocytogenes*.

À professora Vera Lúcia Mores Rall, pela contribuição na correção do trabalho e pelo auxílio nos momentos que precisei de suas orientações.

Ao Professor José Carlos Pantoja, pela consultoria e trabalho estatístico.

À amiga Cibeli Viana, que esteve ao meu lado desde a época do mestrado e que tive a felicidade de trabalhar conjuntamente neste projeto. Agradeço o apoio, confiança, comprometimento e amizade.

Aos amigos de Botucatu, Thiago Spina "Ktota", Fábio "Cid" Possebon, André Matos "Parma" e Ricardo "Curan" pela ajuda.

Ao Vinicius Ribeiro pelos ensinamentos e auxílio nas análises de biologia molecular deste trabalho.

Ao Anderson Camargo pela colaboração na sorotipificação das culturas de *L. monocytogenes*.

À Vanessa Vidotto, pela paciência, atenção e auxílio nas atividades administrativas do trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio financeiro para execução deste trabalho.

Aos matadouros-frigoríficos, especialmente na figura dos gerentes e chefes dos Serviços de Controle e Garantia da Qualidade que permitiram a realização do trabalho e funcionários que colaboraram durante as coletas de amostras.

Aos Serviços de Inspeção Federal (SIF) pelo consentimento para a realização das atividades necessárias para a condução da pesquisa, em especial ao FFA César Barradas.

À velha e nova guarda de funcionários, técnicos, estagiários, residentes e pós-graduandos do Serviço e Orientação à Alimentação Pública (SOAP) da UNESP pelos anos de convivência, amizade e colaboração.

Aos colegas do Laboratório Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA) da Universidade Federal do Paraná, Rosana, Cláudia, Nelson, Camila, Ana Paula, Rosângela, Jorge, Mallú, Fabiane, Juliana e Erton. Obrigado pelo convívio, incentivo, amizade e especialmente pelo auxílio nas atividades relacionadas ao projeto.

Às funcionárias Kátia e Lúcia e aos pós-graduandos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Aline, Erika, Crys, Dani, Vanessa, Rafa, Fabi, Isa e Jana pela acolhida, ajuda, companhia e amizade.

Aos amigos Cida, Gilda, Edson e Letícia pela amizade sincera, conselhos e pela calorosa acolhida em Botucatu.

À Yuri que gentilmente abriu as portas de sua casa e proporcionou deliciosas conversas ao fim do dia.

E a todos, que direta ou indiretamente, estiveram presentes e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Obrigada !!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	População média de micro-organismos mesófilos (log UFC/cm ²) em esteiras de quatro linhas de processamento submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água.	23
TABELA 2	População média de micro-organismos mesófilos (log UFC/cm ²) em esteiras submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água de quatro linhas de processamento (A, B, C e D).	24
TABELA 3	População média de micro-organismos mesófilos (log UFC/cm ²) em esteiras de quatro linhas de processamento submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água coletadas em quatro diferentes momentos (T ₀ , T ₁ , T ₂ e T ₃).	29
TABELA 4	População média de enterobactérias (log UFC/cm ²) em esteiras de quatro linhas de processamento submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água	31
TABELA 5	População média de enterobactérias (log UFC/cm ²) em esteiras submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água de quatro linhas de processamento (A, B, C e D).	32
TABELA 6	População média de enterobactérias (log UFC/cm ²) em esteiras de quatro linhas de processamento submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água coletadas em quatro diferentes momentos (T ₀ , T ₁ , T ₂ e T ₃).	34
TABELA 7	Espécies de <i>Listeria</i> isoladas de amostras de superfícies de esteiras lisas e modulares, com e sem aspersão de água de quatro linhas de processamento.	35
TABELA 8	Frequência de isolamento de <i>L. monocytogenes</i> em amostras de esteiras lisas e modulares com e sem aspersão de água.	37
TABELA 9	Razão de chance (OR) e intervalo de confiança (IC) da pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> em amostras de esteiras lisas e modulares com e sem aspersão de água.	39
TABELA 10	Frequências, Razão de Chance (OR) e intervalo de confiança (IC) da pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> em amostras de esteiras lisas e modulares com e sem aspersão avaliadas em diferentes tempos (T ₀ , T ₁ , T ₂ e T ₃).	43
TABELA 11	Sorotipos identificados de culturas de <i>L. monocytogenes</i> obtidas a partir do isolamento em amostras superficiais de esteiras de quatro linhas de processamento (A, B, C e D).	44

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Linhas de processamento, esteiras e cortes de frangos transportados.....	16
QUADRO 2	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na sorotipagem molecular de <i>L. monocytogenes</i>	19

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esteiras utilizadas no experimento. A – Esteira modular / B – Esteira lisa.	15
FIGURA 2	Perfis e taxa de similaridade das cepas submetidas à macrorestrição pela enzima <i>Apal</i>	46
FIGURA 3	Perfis e taxa de similaridade das cepas submetidas à macrorestrição pela enzima <i>Ascl</i>	47
FIGURA 4	Mapa dos perfis da linha de processamento A e dos perfis combinados das linhas B, C e D de culturas submetidas à macrorestrição com as enzimas <i>Apal</i> e <i>Ascl</i> , de acordo com esteira, momento e data de coleta.	49

SUMÁRIO

RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Higienização na indústria de alimentos	2
2.2 Higienização X consumo de água	5
2.3 Características de <i>L. monocytogenes</i>	7
2.4 Listeriose alimentar	8
2.5 <i>L. monocytogenes</i> em alimentos e ambientes de processamento	10
2.6 Controle de <i>L. monocytogenes</i>	12
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Local de coleta	15
4.2 Superfícies avaliadas e protocolos de higienização	15
4.3 Coleta das amostras	16
4.4 Amostragem	17
4.5 Análises microbiológicas	17
4.5.1 Contagem de micro-organismos mesófilos	17
4.5.2 Contagem de enterobactérias	18
4.5.3 Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	18
4.5.3.1 Sorotipagem molecular das culturas de <i>L. monocytogenes</i>	18
4.5.3.2 Tipagem molecular das cepas de <i>L. monocytogenes</i>	20
4.6 Análise dos dados	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

5.1 Efeito da aspersão de água na contaminação por mesófilos	23
5.2 Efeito da aspersão de na contaminação por enterobactérias	31
5.3 Efeito da aspersão de água na contaminação por <i>L. monocytogenes</i>	35
5.3.1 Caracterização molecular de <i>L. monocytogenes</i>	43
5.3.2 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	45
 6 CONCLUSÕES	 51
 7 REFERÊNCIAS	 52
 8 TRABALHO CIENTÍFICO	 60

SOARES, V.M. Efeito da aspersão de água sobre a contaminação microbiológica em esteiras transportadoras de cortes de frango. Botucatu, 2014, 81p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do uso de aspersão de água como forma de higiene operacional em esteiras sanitárias condutoras de cortes de frango em quatro linhas de processamento. Em cada linha de processamento, foram coletadas amostras de dois tipos de esteiras (modular e lisa) higienizadas com água e não higienizadas, em quatro tempos distintos (T_0 , T_1 , T_2 e T_3). As amostras foram submetidas à contagem de mesófilos, enterobactérias e pesquisa de *L. monocytogenes*. Culturas de *L. monocytogenes* foram submetidas à sorotipagem e a PFGE. Foram realizadas dez repetições do experimento em cada linha de processamento. Com base nos resultados foi possível observar que o efeito da utilização da aspersão com água foi dependente de diversos fatores, tais como a linha de processamento, tipo de corte, design do equipamento e o tipo de esteira. A higienização por aspersão não foi o fator primordial para garantir a eliminação de *L. monocytogenes*, uma vez que o patógeno foi isolado independente da linha de processamento e tipo de esteira, além disso, os pulsotipos encontrados evidenciaram a disseminação do patógeno nas linhas de processamento avaliadas. Deste modo, a decisão de retirar a água do processo de higienização de esteiras condutoras deve ser precedida de um estudo criterioso para garantir que a sua ausência não venha influenciar na inocuidade dos produtos de origem animal.

Palavras-chave: carne de aves; contaminação; esteiras condutoras; *L. monocytogenes*; micro-organismos indicadores.

SOARES, V.M. Effect of water spray on microbiological contamination in conveyor belts of chicken cuts. Botucatu, 2014, 81p. Tese (Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of the use of water spray on cleaning of conveyor belts in four broiler lines processing in Brazilian slaughterhouses. Surface samples were collected of two types of conveyor belt (modular and smooth) which passed through two processes (with and without water spray), in four times (T_0 , T_1 , T_2 and T_3). The samples were subjected to mesophilic and enterobacteria count, and research of *L. monocytogenes*. Cultures of *L. monocytogenes* were serotyped and submitted to PFGE. Ten replicates of the experiment were performed on each processing line. The results demonstrated that the effect of the use of spraying with water was dependent on several factors, such as the processing line, product type, equipment design and the type of conveyor belt. The cleaning spray is not the primary factor in ensuring the elimination of *L. monocytogenes*, because the pathogen was isolated independent of the type of conveyor belt and processing line, moreover, PFGE demonstrated the dissemination in the processing lines. Thus, the decision to remove the water from the cleaning of conveyor belts must be preceded by a study to ensure that the absence of this procedure does not influence the safety of products of animal origin.

Keywords: Chicken meat; contamination; conveyor belts, indicator microorganisms, *L. monocytogenes*.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o maior exportador mundial de carne de aves. Esta posição se deve, em grande parte, à modernização do setor e a tecnologia aplicada nas operações de abate e processamento com o objetivo de atender os mercados interno e externo e suportar a crescente demanda pelo aumento da produção de alimentos de origem animal.

Para a modernização e agilidade dos processos de desossa, utilizam-se esteiras condutoras que, por entrarem em contato direto com as carcaças e cortes de frango, recomenda-se a higienização por meio de aspersão contínua de água. Esse sistema de higienização tem como finalidade evitar que a contaminação proveniente do produto cru que entra em contato com a superfície seja transferida aos produtos que irão ser processados nas mesmas esteiras.

A higienização contínua com a utilização de aspersores eleva significativamente os gastos com água dentro do processo de industrialização da carne de aves. Além disso, o aumento da umidade dentro da sala de cortes, devido à presença de aerossóis, pode auxiliar na disseminação de micro-organismos, levando à contaminação dos produtos manipulados nas superfícies destinadas à manipulação de alimentos.

Neste sentido, alguns estudos têm surgido nos últimos anos visando a redução da utilização da água e até sugerindo a retirada por completo em alguns procedimentos indústrias, dentre eles a higienização de superfícies. Porém, essa retirada deve ser realizada com muito critério para garantir que a ausência da água neste procedimento não venha a comprometer à inocuidade dos alimentos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do uso de aspersão de água sob pressão como forma de higiene operacional sobre a população de micro-organismos indicadores de higiene e a presença de *Listeria monocytogenes* em esteiras condutoras de cortes em quatro linhas de processamento de matadouros de frangos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Higienização na indústria de alimentos

A higienização de superfícies de manipulação de alimentos é parte fundamental para a obtenção de produtos com qualidade microbiológica e que não ofereçam riscos de veiculação de patógenos aos consumidores.

Nas indústrias de produtos de origem animal, estes procedimentos fazem parte dos chamados Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), que devem ser elaborados, descritos, implantados e monitorados visando estabelecer a forma rotineira pela qual o estabelecimento industrial evitará a contaminação cruzada entre superfícies de contato e os produtos, preservando sua qualidade e integridade por meio da higiene antes, durante e depois das operações de industrialização dos alimentos (BRASIL, 2003).

Os PPHO devem descrever os procedimentos de limpeza e sanitização, compreendendo a conservação e manutenção sanitária de instalações, equipamentos e utensílios e a frequência dos procedimentos adotados (antes, durante e após a operação industrial).

Deve dispor de especificação e controle das substâncias detergentes e sanitizantes utilizadas e de sua forma de aplicação, meios de monitorização da eficiência da higienização e respectivas frequências, bem como aplicação de ações corretivas a eventuais desvios, garantindo o apropriado destino aos produtos não conformes (BRASIL, 2003).

Basicamente na indústria, o plano PPHO é composto pelas atividades pré-operacionais e operacionais. As pré-operacionais abrangem os procedimentos de higiene executados antes do início das atividades industriais; já as operacionais estão relacionadas à limpeza e sanitização dos equipamentos e utensílios durante a produção e nos intervalos entre turnos (BRASIL, 2003).

Um protocolo de higienização compreende duas etapas: limpeza e sanitização. A primeira tem por objetivo remover os resíduos orgânicos e inorgânicos das superfícies utilizando água e soluções detergentes e a segunda visa a eliminação de patógenos e a redução, a níveis aceitáveis, de micro-organismos deteriorantes pela utilização de sanitizantes.

Geralmente, a higienização completa (limpeza e sanitização) é realizada apenas nas atividades pré-operacionais, por requerer um tempo maior. Durante as operacionais, métodos contínuos são os mais utilizados e tem como objetivo a eliminação constante da matéria orgânica presente nas superfícies, evitando que este material se acumule e dificulte o processo de higienização completa ao término do turno de trabalho.

Em áreas de manipulação de produtos cárneos, especificamente em salas de cortes de matadouros de aves, bovinos e suínos, é comum a utilização de mesas contínuas conhecidas como esteiras sanitárias condutoras.

Em estabelecimento de aves, a higienização operacional dessas esteiras é realizada com a aspersão de água (preferencialmente morna), sendo uma prática rotineira devido às exigências estabelecidas por meio da Portaria 210 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a fim de atender, basicamente, aos interesses sanitários dos países importadores e por se considerar que é um processo de higiene operacional de fluxo contínuo (BRASIL, 1998; BERSOT et al., 2012; SOARES et al., 2014).

Esse sistema de higienização com a utilização de água tem como finalidade evitar que a contaminação proveniente do alimento que entra em contato com a superfície seja transferida aos novos produtos que são processados nas mesmas superfícies (BERSOT et al., 2012; SOARES et al., 2014).

O processo de higienização, quando obedece corretamente as etapas de limpeza e sanitização, é de extrema importância pois evita a permanência de matéria orgânica e de micro-organismos deteriorantes e patogênicos que podem ser transferidos para os alimentos durante as etapas de processamento (THÉVENOT et al., 2005).

Neste sentido, Rodrigues et al. (2013) verificaram que esteiras condutoras de corte de frango onde foi detectada a presença de *Listeria* antes da sanitização tornavam-se livres da contaminação após sanitização. Já Gómez et al. (2014) isolaram *L. monocytogenes* de esteiras condutoras inadequadamente higienizadas.

Para garantir a qualidade da higienização e, conseqüentemente, a qualidade microbiológica dos produtos que são processados em plantas de abate, as superfícies que entram em contato com os produtos devem ser

periodicamente avaliadas para garantir que os procedimentos de higienização estejam sendo realizados de forma correta e eficaz. Deste modo, a aplicação de medidas de verificação da eficiência da higienização é imprescindível para garantir a qualidade de produtos elaborados em plantas processadoras de alimentos.

O primeiro método que deve ser utilizado para a avaliação da higienização é a inspeção visual das superfícies e equipamentos. Embora seja um método não completamente confiável, pode possibilitar a detecção de falhas grosseiras no processo de higienização, porém, a não observação de resíduos numa superfície não indica que esta se encontra completamente limpa.

Este tipo de inspeção deve ser realizada por pessoa treinada, com preparação e experiência, com capacidade para avaliar corretamente o nível de limpeza. De qualquer maneira, para a verificação da confiabilidade da inspeção visual, deve ser realizada periodicamente a avaliação por ensaios microbiológicos.

Na avaliação microbiológica, são utilizados *swabs* ou esponjas em uma área pré-determinada da superfície a ser amostrada. Posteriormente, os *swabs*/esponjas são acondicionados em tubos ou sacos plásticos estéreis contendo solução diluente para que, no laboratório, seja realizada a análise pretendida baseada na escolha do micro-organismo ou grupo de micro-organismos. Contudo, apesar das análises microbiológicas serem simples e de fácil interpretação, requerem mão-de-obra laboratorial além de o resultado ser conhecido no mínimo após 24-48 h a partir da amostragem.

Em indústrias de alimentos de origem animal, a inspeção para a avaliação da eficiência das higienizações realizadas (pré-operacional e operacional) deve ser realizada pelo órgão de fiscalização, além daquela efetuada rotineiramente pelo setor industrial responsável. O Serviço de Inspeção Federal brasileiro, por meio da Circular 175 (BRASIL, 2005) estabelece formas de verificação dos programas de autocontrole que as indústrias devem ter implementados, onde estão incluídos os controles higiênico-sanitários dos equipamentos e utensílios.

O monitoramento e a verificação oficial *in locu* são executados diariamente logo após a conclusão dos procedimentos pré-operacionais de higienização e têm como objetivo avaliar se os mesmos foram corretamente executados de modo a assegurar a qualidade microbiológica da superfície, prevenindo a contaminação bacteriana e a contaminação cruzada.

2.2 Higienização X consumo de água

Para que uma superfície seja corretamente higienizada e que tenha uma boa qualidade microbiológica, diversos fatores relacionados à técnica de higiene operacional e pré-operacional devem ser levados em consideração, dentre eles a quantidade e a pressão da água utilizada.

Devido ao fato de que durante a higiene operacional os aspersores ficam ligados e direcionados para as superfícies que entram em contato com os produtos, o gasto de água é significativo. Segundo a Portaria 210 do MAPA, o consumo médio de água em matadouro de aves deve ficar em torno de 30 L por ave abatida, incluindo o consumo de todas as seções do matadouro. Volume inferior é permitido desde que preservados os requisitos tecnológicos e higiênico-sanitários (BRASIL, 1998).

Este gasto considerável é uma preocupação da indústria tanto pela questão econômica, devido ao próprio custo da água e de seu tratamento posterior, quanto ambiental, por fatores relacionados ao despejo dos efluentes no meio ambiente. Além disso, essa discussão é extremamente relevante pelo fato da água ser um bem essencial esgotável e até mesmo escasso em muitas regiões do país e do mundo, cabendo à indústria de alimentos utilizá-la de forma racional.

Neste sentido, algumas vertentes estão surgindo nos últimos anos propondo a redução do volume de água utilizada nos procedimentos de higiene industrial e nos demais processos de industrialização da carne de aves.

Visando a redução da quantidade de água utilizada no pré-resfriamento de aves, Souza-Júnior et al. (2012) avaliaram o efeito do aumento do tempo de renovação da água do *chiller* de 8 h (BRASIL, 1998) para 16 h. Os autores verificaram que não houve diferença significativa nas contagens de micro-organismos mesófilos, enterobactérias, coliformes e *E. coli* quando se

aumentou o tempo de renovação de água para 16 h, sugerindo que esta prática seria importante para a economia de água durante o processo de abate de aves.

Estudos em esteiras de matadouros higienizadas por métodos alternativos têm sido realizados visando a diminuição da água bem como na redução dos gastos com energia elétrica e utilização de detergentes e sanitizantes. Axelsson et al. (2013) avaliaram a tecnologia de ultrassom como substituição à higienização convencional (água, detergente e sanitizante) em diferentes esteiras condutoras de alimentos.

Os resultados demonstraram a redução de 1 a 2 ciclos logarítmicos nas contagens microbianas quando comparadas com aquelas detectadas com o emprego da higienização convencional. Tolvanén et al. (2007) avaliaram esta mesma tecnologia frente à contaminação por *L. monocytogenes* em esteiras e observaram redução significativa nas contagens do patógeno em superfícies de polipropileno e aço inoxidável.

A utilização de radiação ultravioleta também tem sido reportada como uma alternativa eficiente na redução da contaminação de esteiras. Morey et al. (2010) observaram que a luz ultravioleta influenciou na redução das contagens de *L. monocytogenes*, sugerindo que esta tecnologia pode ser aplicada de modo a diminuir os gastos com água dentro do processo de higienização industrial.

Além destas tecnologias, existe a hipótese da retirada por completo da água na higienização das esteiras, uma vez que há maior formação de aerossóis e de dispersão de partículas de água aumentando a umidade e podendo promover maior disseminação de matéria orgânica, permitindo a disseminação de micro-organismos que contaminariam os produtos de forma gradativa e contínua.

O fato é que não existem subsídios suficientemente comprovados da eficácia da utilização da água na higiene operacional e de sua ação frente à redução da contaminação. De qualquer forma, a retirada da água deve ser feita com cautela e a tomada de decisão a respeito deste assunto deve ser baseada em estudos criteriosos que garantam que a ausência deste procedimento não influencie na contaminação dos produtos de origem animal, principalmente por micro-organismos patogênicos como *L. monocytogenes*.

2.3 Características de *L. monocytogenes*

Dentre as espécies que compõe o gênero *Listeria*, *L. monocytogenes* é a única considerada patogênica aos humanos, sendo mundialmente reconhecida como um importante patógeno veiculado por alimentos e responsável por causar surtos de listeriose em humanos e animais (FORSYTHE, 2005; JAY et al., 2005; JAY, 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008). As outras espécies que compõe o gênero são *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. marthii* e *L. rocourtiae* (LECLERCQ et al., 2009; GRAVES et al., 2010).

Estas espécies podem ser diferenciadas pela realização de testes fenotípicos como a fermentação de açúcares e características hemolíticas (DOYLE et al., 1997; JAY et al., 2005; JAY, 2005).

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Listeria* são bacilos curtos (0,4 a 0,5 μm de diâmetro e 0,5 a 2 μm de comprimento), Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e cápsulas. São móveis a temperatura de 25°C devido a presença de flagelos peritríquios. *L. monocytogenes* pode multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura (0 a 45°C) e pH (4,6 - 9,6), além de tolerar concentrações salinas elevadas ($\geq 10\%$), apresentando uma capacidade de sobreviver em condições ambientais desfavoráveis (DOYLE et al., 1997; JAY et al., 2005; JAY, 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

As espécies do gênero *Listeria* podem ser caracterizadas pela presença de antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (JAY et al., 2005). Por esta classificação, *L. monocytogenes* é atualmente dividida em 13 sorotipos (RYSER & MARTH, 2006), sendo que os mais isolados e associados à ocorrência da listeriose humana são 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b (JAY et al., 2005; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; RAGON et al., 2008), sendo este último responsável por 50% dos casos da doença em humanos.

Os sorotipos 1/2a, 1/2b e 1/2c predominam em amostras isoladas de alimentos e ambientes de processamento (ROCOURT et al., 1989; GILOT et al., 1996; OJENIYI et al., 1996).

Existe ainda a diferenciação de *L. monocytogenes* em três linhagens genéticas, sendo possível a sua caracterização pela realização da PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – Eletroforese em Campo Pulsado), considerada o método padrão ouro (*gold standard*) para essa determinação por ser uma técnica reprodutível e com alto poder discriminatório (GRAVES et al., 2001; DOUMITH et al., 2004).

Por este método, os sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e são agrupados em um grupo genético ou linhagem I. Os sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c são agrupados numa linhagem II e a terceira linhagem filogenética dentro de *L. monocytogenes* é composta pelos sorotipos 4a e 4c (ILSI, 2005; RAGON et al., 2008). Informações sobre as diferentes linhagens são importantes para determinar associações entre os diferentes subtipos de *L. monocytogenes* e casos de listeriose humana e animal (ILSI, 2005).

2.4 Listeriose alimentar

L. monocytogenes é frequentemente isolada de alimentos, sendo estes os principais veículos para a infecção de humanos e animais. Estudos relatam o seu isolamento em carne e produtos cárneos, leite cru e subpasteurizado, queijos, sorvetes, alimentos prontos para o consumo, saladas e alimentos de origem marinha, inclusive alimentos refrigerados (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004; SANT'ANA et al., 2012; CARTWRIGHT et al., 2013; EFSA, 2013a).

Uma série de sinais clínicos são observados em casos de listeriose de origem alimentar. A ingestão de alimentos contaminados com este patógeno é particularmente perigosa para pessoas dentro de grupos de risco, como por exemplo, idosos ou pessoas acometidas por doenças que comprometam o sistema imunológico. Os índices de mortalidade nestes casos podem variar de 20 a 30%. Nestes grupos, a infecção resulta em sinais como meningite, meningoencefalite e septicemia, sendo que o agravamento destes sinais muitas vezes pode levar à morte.

Em mulheres grávidas, *L. monocytogenes* pode infectar o feto e causar aborto ou nascimento prematuro. Os recém-nascido podem infectar-se durante o parto e desenvolver meningite (GELLIN & BROOME, 1989; JENSEN et al., 1994; GOULET & MARCHETTI, 1996).

O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas e a dose infectante ainda não é bem definida. Estima-se que esteja entre 10^3 a 10^9 UFC (FARBER et al., 1996; DALTON et al., 1997), contudo existem alguns relatos onde surtos ocorreram com contaminação muito baixa dos alimentos envolvidos (MEAD et al., 1999).

Devido à capacidade de tolerar o pH gástrico, enzimas proteolíticas e sais biliares, *L. monocytogenes* entra no organismo via trato digestório (SLEATOR et al., 2003). Uma vez no hospedeiro, é capaz de induzir sua captação e transpassar de célula a célula podendo permanecer viável um longo tempo no interior de macrófagos. Após essa fase, alcança a corrente sanguínea devido à capacidade de atravessar as barreiras intestinal, hematoencefálica e placentária, tendo especial tropismo pela placenta e sistema nervoso central (LECUIT, 2005).

Dados oficiais do *Centers for Disease Control and Prevention* do Departamento de Saúde dos Estados Unidos demonstram que, de 1998 a 2008, ocorreram 25 surtos de listeriose naquele país, acometendo 353 pessoas com 216 hospitalizações e 48 mortes (EUA, 2013a). Este mesmo sistema de vigilância apontou que, de 2009 a 2010, ocorreram 9 surtos com 49 doentes e 40 hospitalizações (EUA, 2013b). Contudo, o valor real é provavelmente maior devido à subnotificação.

Neste sentido, estudos apontaram que *L. monocytogenes* causa a doença em aproximadamente 2500 pessoas por ano com cerca de 500 mortes nos Estados Unidos (MEAD et al., 1999). Na União Europeia, em 2011 foram confirmados 1.476 casos de listeriose humana de origem alimentar (EFSA, 2013b). Todos estes dados indicam que este patógeno é o que apresenta a maior taxa de mortalidade dentre os de origem alimentar.

No Brasil, há uma grande deficiência no diagnóstico clínico e na notificação de casos e surtos de listeriose alimentar, o que se reflete na inexistência de relatos oficiais por parte das autoridades sanitárias, conflitando com os vários relatos de listeriose humana no Brasil. Vale ressaltar que nenhum destes relatos relaciona a patologia com a ingestão de alimentos contaminados (HOFER et al., 1998, 1999) embora, este fato possa estar relacionado à falta de conhecimento por parte da comunidade médica em

relação à importância dos alimentos na disseminação de *L. monocytogenes*, o que dificulta a identificação da fonte da doença (DESTRO, 2013).

Uma característica importante de *L. monocytogenes* é a sua distribuição ubiquitária, sendo encontrada amplamente distribuída na natureza e altamente adaptada para sobreviver no ambiente, sendo o homem e os animais os reservatórios para o patógeno (FENLON, 1999; JAY et al., 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Esta característica, somada à capacidade de formação de biofilmes bacterianos e à habilidade de suportar condições ambientais desfavoráveis, tornam *L. monocytogenes* muito frequente em plantas de processamento de produtos de origem animal (BERSOT et al., 2001; DJORDJEVIC et al., 2002; HARVEY et al., 2007; BERSOT et al., 2008; CHIARINI et al., 2009).

O elevado índice de contaminação de plantas de processamento gera preocupações de ordem sanitária pela possibilidade de contaminação cruzada dos produtos de origem animal e, conseqüentemente, o aumento da probabilidade da ocorrência de casos de listeriose humana de origem alimentar (ICMSF, 1996).

2.5 *L. monocytogenes* em alimentos e ambientes de processamento

Uma vez no ambiente de processamento, a contaminação de alimentos pode ser recorrente, pois algumas cepas de *L. monocytogenes* podem persistir por meses ou até anos aderidas às superfícies se desprendendo de forma intermitente pela presença de biofilmes (MARKKULA et al., 2005).

Pesquisas em matadouros de aves demonstraram a disseminação deste patógeno no ambiente e nas instalações industriais. No Brasil, Nalério et al. (2009) isolaram o micro-organismo em vários pontos da cadeia de produção de aves, incluindo equipamentos da área de depenagem, evisceração, pré-resfriamento e sala de cortes, além de isolarem *L. monocytogenes* nas amostras de frangos resfriados.

Também no Brasil, Chiarini et al. (2009) avaliaram superfícies, equipamentos, mãos de manipuladores e produtos finais de dois estabelecimentos de abate de aves, encontrando uma positividade total de 20,9% no estabelecimento com evisceração automática e 16,4% no com

evisceração manual, com destaque para as superfícies de contato da área de evisceração, sala de cortes e ambiente de produção de carne mecanicamente separada. A contaminação para os produtos finais também foi avaliada e, da mesma forma, o patógeno foi encontrado.

Sakaridis et al. (2001) encontraram uma positividade variando de 16 a 60% em carcaças de frangos de quatro matadouros na Grécia, com uma média de 38%. Resultados semelhantes foram obtidos em dois estudos realizados na Espanha por Capita et al. (2001) e Vitas et al. (2004) que encontraram uma positividade de 32 e 36,1% de carcaças de frango contaminadas com *L. monocytogenes*, respectivamente.

Barros et al. (2007), no Brasil, encontraram uma positividade de 25,9% para carcaças bovinas, 22,2% em linguças frescas e 25% em carnes moídas coletadas de matadouros e estabelecimentos comerciais de carne. Além disso, *L. monocytogenes* foi isolada do ambiente de produção, sendo encontrada em equipamentos e utensílios das indústrias, tais como facas, caixas metálicas, moedores e mesas de aço inoxidável.

Meloni et al. (2013) avaliaram a disseminação de *L. monocytogenes* em cinco plantas de processamento de carne suína da Itália durante três anos. Os autores encontraram uma positividade de 33% nas carcaças suínas e 23% em equipamentos, utensílios e superfícies de contato. Este estudo ainda demonstrou que algumas das cepas isoladas permaneceram por vários meses nos matadouros, mesmo sendo aplicadas medidas de higienização para evitar a contaminação.

Em carcaças bovinas, Wieczorek et al. (2012) observaram uma contaminação por *L. monocytogenes* na ordem de 10,8% em carcaças obtidas de matadouros da Polônia.

Na China, Zhu et al. (2012) avaliaram três matadouros (A, B e C) de bovinos durante um período de sete meses, coletando amostras de couro, das carcaças na pré-evisceração, pós-evisceração e pós-lavagem, carcaças resfriadas, produtos finais e amostras ambientais. *L. monocytogenes* foi isolada em todos os pontos da cadeia de produção com destaque para as amostras do matadouro B. Nesta indústria, o couro apresentou 76,2% de positividade e as amostras coletadas de carcaças na pré-evisceração, pós-evisceração e pós-lavagem apresentaram 80%, 70,6%, 81,8% de positividade, respectivamente.

Carcaças frias apresentaram 95% de positividade e todas as amostras do produto final bem como do ambiente foram positivas na pesquisa do patógeno.

Ochiai et al. (2010), no Japão, avaliaram 379 amostras de carne comercializadas em estabelecimentos da região metropolitana de Tóquio. Os autores encontraram uma prevalência de 15,5% nas amostras de carne bovina, 28,7% nas de aves, 35,7% na suína e 54,5% na carne moída suína.

Carne moída bovina comercializada em supermercados chilenos foi avaliada por Foerster et al. (2012), sendo que do total avaliado, 37% das amostras foram positivas para *L. monocytogenes*.

2.6 Controle de *L. monocytogenes*

Como forma de controlar este patógeno e evitar a ocorrência de listeriose de origem alimentar, alguns países têm estabelecido critérios ou limites legais para o número de *L. monocytogenes* permitido em alimentos, especialmente produtos prontos para o consumo.

Nos Estados Unidos, devido à alta mortalidade causada pela listeriose, a política é rígida, levando os órgãos de fiscalização sanitária a adotar o sistema de tolerância zero, ou seja, alimentos não podem apresentar o patógeno quando avaliados laboratorialmente, levando ao recolhimento do comércio quando é detectada a sua presença na amostra analisada.

Outros países como Canadá, Alemanha e países da União Europeia também são criteriosos e mantêm uma política sanitária de modo a garantir a segurança dos alimentos de origem animal no que tange a ausência de *L. monocytogenes* na maioria dos alimentos (JAY et al., 2005).

No Brasil também existem parâmetros para o controle de *L. monocytogenes*, mas este está restrito apenas a um tipo de alimento. A Portaria 146 do MAPA (BRASIL, 1996) estabelece os requisitos microbiológicos para queijo e determina que os de umidade acima de 46% devem ser isentos deste patógeno.

Da mesma forma, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio da RDC 12 (BRASIL, 2001) determina a ausência deste micro-organismo em unidades amostrais de queijo. Cabe ressaltar que estas duas são as únicas legislações que estabelecem parâmetros para *L. monocytogenes* em alimentos

em nosso país e que os queijos são os únicos alimentos que possuem parâmetros microbiológicos para tal patógeno.

Outra forma de fiscalização e controle é o realizado pelo MAPA por meio da Instrução Normativa 9, que estabelece os procedimentos de controle de *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. Esta regulamentação tem como objetivo monitorar e assegurar a inocuidade de produtos de origem animal prontos para o consumo em indústrias de alimentos.

O controle oficial é baseado na coleta rotineira de amostras para a avaliação microbiológica, a inspeção e verificação das instalações no que diz respeito à contaminação cruzada, facilidade de limpeza e sanitização, avaliação da matéria-prima e a avaliação dos métodos utilizados como forma de evitar a multiplicação bacteriana ao longo do processo de produção de alimentos (BRASIL, 2009).

Este controle realizado durante o processo de produção é uma das principais medidas que se tem tomado ultimamente, no Brasil, para evitar a contaminação de alimentos por *L. monocytogenes*.

Uma vez que a bactéria é amplamente distribuída na natureza, suporta situações de estresse e forma biofilme, é necessário prevenir sua entrada nos ambientes de processamento; para tanto, deve-se fazer o controle nos pontos de origem da matéria-prima por meio de medidas que minimizem as chances de contaminação (BERESFORD et al., 2001; CHMIELEWSKI & FRANK, 2003; GANDHI & CHIKINDAS, 2007).

Além do controle da matéria-prima, é de suma importância que as indústrias tenham programas efetivos de higienização de modo a controlar as condições ambientais, evitando que os equipamentos e utensílios utilizados no processamento do alimento sejam os responsáveis pela contaminação inicial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do uso de aspersão de água como forma de higiene operacional em esteiras sanitárias condutoras de cortes de frango em quatro linhas de processamento em matadouros de aves de grande importância na comercialização em território nacional e na exportação de frangos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da higienização operacional por aspersão de água nas contagens de micro-organismos mesófilos e enterobactérias e na presença de *L. monocytogenes* em superfícies de esteiras lisas e modulares utilizadas em linhas de processamento de matadouros de aves.

Determinar os sorotipos e perfis moleculares de *L. monocytogenes* isolados de superfícies de esteiras lisas e modulares com e sem aspersão de água utilizadas em linhas de processamento de matadouros de aves.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de coleta

As amostras superficiais das esteiras foram colhidas em quatro linhas de processamento de matadouros habilitados para a exportação e de grande expressão na produção e comercialização de produtos avícolas para o comércio nacional e internacional, com volume diário de abate de aves de 320.000 (linha de processamento A), 440.000 (linha B), 170.000 (linha C) e 320.000 (linha D).

4.2 Superfícies avaliadas e protocolos de higienização

Foram avaliadas esteiras condutoras de cortes de frango dos tipos modular (polietileno) e lisa (poliuretano) (Figura 1). O sistema de higienização contínua das esteiras consistia na utilização de aspersores de água afixados em um dado ponto da esteira para permitir a higienização da superfície durante o seu movimento.

Foram selecionadas quatro esteiras (duas modulares e duas lisas), sendo que em uma esteira de cada tipo o sistema de higienização foi completamente desligado durante o período do experimento.

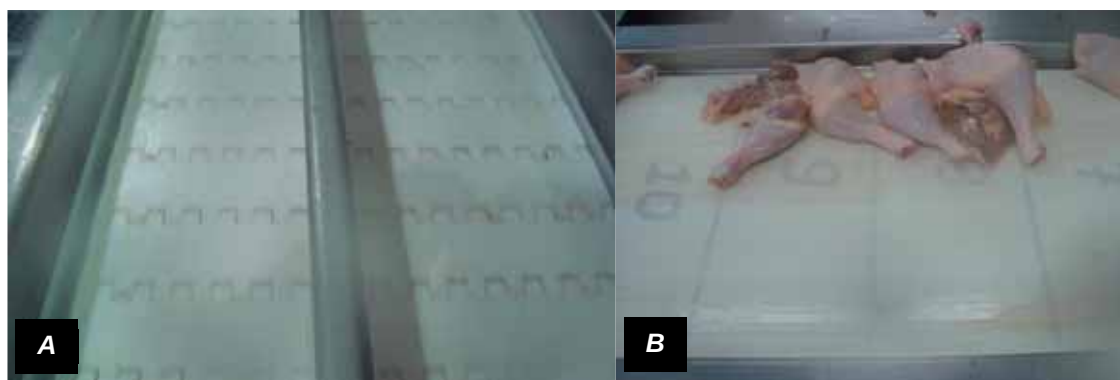


Figura 1. Esteiras utilizadas no experimento. A – Esteira modular / B – Esteira lisa.

As esteiras avaliadas na presente pesquisa transportavam cortes de uma carcaça de frango tais como asas, sobrecoxas, peito e pele. A descrição das linhas de processamento, as esteiras e os cortes transportados estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Linhas de processamento, esteiras e cortes de frangos transportados.

Linha	Esteira lisa		Esteira modular	
	Com aspersão	Sem aspersão	Com aspersão	Sem aspersão
A	Coxa/sobrecoxa ¹	Coxa/sobrecoxa ¹	Pele	Meio/coxinha da asa ¹
B	Filé de peito	Meio/coxinha da asa ¹	Filé de peito	Filé de peito
C	Coxa/sobrecoxa ¹	Meio/coxinha da asa ¹	Peito ¹	Peito ¹
D	Peito ¹	Peito ¹	Filé de Peito	Filé de peito

¹Corte com presença de pele.

4.3 Coleta das amostras

Para a tomada das amostras com vistas às contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e enterobactérias, foi utilizada como referencial a metodologia sugerida pela Decisão nº 471/2001 da Comunidade Europeia (EC, 2001).

As amostras foram coletadas com a utilização de *swabs* esterilizados numa área pré-determinada de 20 cm² (moldes de 4 x 5 cm) tomados em amostras quádruplas e coletados em duplicata (exceto T0).

Dessa forma, cada conjunto de cinco *swabs* correspondeu a uma amostragem de uma área de 100 cm² em cada esteira avaliada. Os *swabs* foram acondicionados em tubos tipo Falcon contendo 10 mL de solução salina peptonada 0,1%. Dessa forma, cada 1 mL correspondeu à uma amostragem de 10 cm² da superfície.

Para a pesquisa de *L. monocytogenes*, foram utilizadas esponjas pré-hidratadas com 10 mL de solução salina peptonada 0,1%, sendo amostradas quatro áreas previamente delimitadas de 100 cm² (totalizando 400 cm²) das superfícies de acordo com as recomendações feitas pelo Health Canada (HC, 2010).

Foi empregado caldo neutralizante Letheen somente na coleta de amostras logo após a higienização pré-operacional.

Após a coleta, os *swabs* e esponjas foram acondicionados sob refrigeração até o momento da realização das análises.

4.4 Amostragem

As amostras foram coletadas em dois turnos trabalho em cada uma das quatro linhas de processamento, respeitando os seguintes intervalos de tempo:

- 1ª coleta - logo após a higienização pré-operacional (T_0);
- 2ª coleta - 1 hora antes do intervalo para almoço (T_1);
- 3ª coleta - 1 hora antes do intervalo para o jantar (T_2) e
- 4ª coleta - 1 hora antes do término do segundo turno (T_3).

Foram realizadas 10 repetições do experimento em cada estabelecimento e em cada uma das esteiras avaliadas, modulares e lisas, obtendo-se ao final das coletas um total de 1120 amostras para contagem de micro-organismos indicadores e 640 amostras para pesquisa de *L. monocytogenes*.

4.5 Análises microbiológicas

4.5.1 Contagem de micro-organismos mesófilos

Os tubos contendo os *swabs* foram homogeneizados em Vortex por um tempo não inferior a 1 minuto. A partir deste mesmo tubo (10^0), foram obtidas diluições decimais de 10^{-1} e 10^{-2} que foram inoculados em Petrifilm™ AC (3M, St. Paul, MN) na quantidade de 1 mL de cada diluição. As placas foram incubadas a 35-37°C/48 h. Após as contagens das colônias, o resultado foi expresso em log UFC/cm².

4.5.2 Contagem de enterobactérias

Foram utilizadas as mesmas diluições decimais obtidas para a contagem de mesófilos, utilizando para a quantificação deste grupo bacteriano placas de Petrifilm™ EB (3M, St. Paul, MN). As placas foram incubadas a 35-37°C/24 h. Após as contagens das colônias, o resultado foi expresso em log UFC/cm².

4.5.3 Pesquisa de *L. monocytogenes*

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada conforme descrito por Pagotto et al. (2001). As bolsas plásticas contendo as esponjas receberam 100 mL de *Listeria* Caldo Base de Enriquecimento (DIFCO) que, após a homogeneização em *stomacher* por 2 min, foram incubadas a 30°C/48 h. Decorrido este período, uma alíquota de 0,1 mL do LEB foi transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser (DIFCO) que foi incubado a 35°C/48 h.

A seguir foi realizada a semeadura em placas de ágar Palcam (DIFCO) e ágar Oxford (DIFCO) sendo ambas incubadas a 35°C/24-48 h. Colônias características de ambos os meios de cultura, foram semeadas em ágar soja tripticase com 0,6% de extrato de levedura (TSAYE-DIFCO) e incubadas a 30°C/24-48 h, para verificação de pureza. Os isolados purificados foram submetidos a provas de produção de catalase, fermentação de carboidratos (xilose, ramnose e manitol), produção de β -hemólise e motilidade.

4.5.3.1 Sorotipagem molecular das culturas de *L. monocytogenes*

As culturas de *L. monocytogenes* foram submetidas à PCR para identificação do sorotipo de acordo com Doumith et al. (2004) e as sequências dos oligonucleotídeos utilizados na sorotipagem molecular de *L. monocytogenes* estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na sorotipagem molecular de *L. monocytogenes*.

Genes	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Sorotipo de <i>L. monocytogenes</i>
<i>Imo0737</i>	For: AGG GCT TCA AGG ACT TAC CC Rev: AGC ATT TCT GCT TGC CAT TC	691	1/2a, 1/2c, 3a e 3c
<i>Imo1118</i>	For: AGG GGT CTT AAA TCC TGG AA Rev: CGG CTT GTT CGG CAT ACT TA	906	1/2c e 3c
<i>ORF2819</i>	For: AGC AAA ATG CCA AAA CTC GT Rev: CAT CAC TAA AGC CTC CCA TTG	471	1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e
<i>ORF2110</i>	For: AGT CCA TCC CTT ACT TTG GAC Rev: CAT CCA TCC CTT ACT TTG GAC	597	4b, 4d e 4e
<i>Prs</i>	For: GCT GAA GAG ATT GCG AAA GAA G Rev: CAA AGA AAC CTT GGA TTT GCG G	370	Todas as espécies de <i>Listeria</i>

Para a extração do DNA, os isolados de *L. monocytogenes* foram purificados em ágar TSAYE e incubados a 30°C por 24 h. Após esse período, 3 a 5 colônias foram transferidas para microtubo contendo 50 µL de uma solução a 0,25% de dodecil sulfato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em solução de 0,05N NaOH estéril. Após homogeneização, os tubos foram incubados em termobloco a 99°C por 15 min. Em seguida, foram adicionados 100 µL de água ultrapura estéril e, após homogeneização, o microtubo foi armazenado a -20°C até o momento da análise.

A reação de PCR foi conduzida em termociclador MasterCycle® PCR (Eppendorf Scientific, Hamburg, Alemanha) utilizando 25 µL, contendo 2µl de DNA, 2U de Taq polimerase (Thermo Scientific, Waltham, EUA), 0,2mM de DNTP (Thermo Scientific, Waltham, EUA); 2 mM de MgCl₂; 10 µL de buffer 10x e os 5 pares de primers (Invitrogen™, EUA) nas seguintes concentrações: 1µM de *Imo0737*, 1µM de *ORF2819*, 1µM *ORF2110*, 1,5µM de *Imo1118* e 1,5µM de *prs*. A amplificação foi conduzida empregando-se as seguintes condições: 3 min a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 0,40 min, 53°C por 1,15 min e 72°C por 1,15 minutos, e um ciclo final a 72°C por 7 min. Controles positivos e negativos foram incluídos no teste.

Alíquotas de 5µL dos produtos gerados na PCR foram adicionadas a 3 µL de tampão para eletroforese (Thermo Scientific, Waltham, EUA) e separadas por eletroforese em 2% de gel de agarose em tampão TBE 0,5x (90mM Trizma base, 90 mM ácido bórico, 2mM EDTA). A visualização do produto amplificado foi realizada por meio de coloração com brometo de etídio.

Os isolados que apresentaram quatro fragmentos de DNA (*Imo0737*, *ORF2110*, *ORF2819* e *prs*) foram submetidos a sorotipificação molecular segundo Borucki & Call (2003), conforme descrito a seguir:

Para a extração do DNA as culturas foram recuperadas em caldo BHI (incubadas overnight). Alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos tipo eppendorf e centrifugadas a 15000 x g por 3 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o DNA de cada cultura foi extraído de acordo com o protocolo do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, EUA).

Na realização do PCR multiplex as reações continham 12,5µL de Go Taq Green Master Mix 2x (Promega), 1µL de cada primer (1µL de D1 F, 1µL de D1 R, 1µL de D2 F, 1µL de D2 R, 1µL de GLT F, 1µL de GLT R) na concentração de 40 pMol, 2µL de DNA e água livre de DNA (Promega) até completar o volume de 25µL (4,5 uL de água). A reação de PCR convencional continham 12,5µL de Go Taq Green Master Mix 2x (Promega), 1µL de cada primer (1µL de *flaA* F e 1µL de *flaA* R), 2µL de DNA e água livre de DNA (Promega) até completar o volume de 25µL (8,5 uL de água).

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose a 2% durante 90 minutos, em voltagem constante de 90 V em tampão TBE 0,5x, e corados utilizando GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). O resultado foi visualizado sob luz ultravioleta, e imagem capturada utilizando o transiluminator LPIX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

4.5.3.2 Tipagem molecular das cepas de *L. monocytogenes*

Para a caracterização filogenética dos isolados de *L. monocytogenes* foi realizada a tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE), através do protocolo proposto pelo PulseNet (EUA, 2009) empregando-se as enzimas *Apal* e *Ascl* (BioLabs, Massachusetts USA).

Colônias purificadas de cada cultura foram diluídas em 2 mL de tampão TE [10 mM Tris-HCl: 1 mM EDTA (Invitrogen, CA, USA)], cuja DO foi corrigida entre 0,8 a 1,0 a 610 nm. Para a formação dos blocos, 400 µL da suspensão das culturas foram transferidos para microtubos contendo 20 µL de lisozima (20

mg/ml) (Roche, New Jersey, USA), com incubação a 55°C por 20 min. Em seguida, 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Minnesota, USA)] e 400 µL da solução 1% SeaKemGold Agarose (Lonza, New Jersey, USA) + 1% SDS foram adicionados e homogeneizados, sendo então distribuídos em moldes acrílicos (BioRad, California, USA).

Os blocos de agarose foram tratados com a solução de lise (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sarcosina e 20 mg/mL proteinase K) em tubos tipo Falcon que foram incubados em *shaker* a 54°C por 2 h. Após duas lavagens sucessivas com água ultrapura estéril a 54°C e quatro com tampão TE a 54°C sob agitação constante (150 rpm), os blocos foram estocados em tampão TE em refrigerador até a restrição enzimática. Porções de cerca de 1/6 dos blocos foram retiradas com lâminas e submetidas à digestão com as enzimas de macrorrestrição, *Apal* ou *Ascl*, em seus respectivos tampões, sendo incubadas a 25°C e a 37°C, por 3 h, respectivamente.

Os produtos da macrorrestrição foram separados por eletroforese em gel de agarose (Agarose SeaKem Gold 1% em tampão TBE 0,5X), empregando-se o equipamento CHEF-DR III® Variable Angle System (BioRad, California, USA) com os parâmetros: voltagem 6V, ângulo interno 120°, tempo de corrida de 18 h e pulsos de 4 a 40 s interpolados.

O gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 µL/mL), a imagem foi registrada sob luz ultravioleta, empregando-se o sistema UVP BioImaging Systems (Digidoc-IT Systems, USA). Os dendrogramas foram construídos utilizando-se o programa BioNumerics (Applied). Lambda Ladder PFG Marker (BioLabs, Massachusetts USA) foi utilizada como referência para padrão de peso molecular.

4.6 Análise dos dados

Inicialmente a distribuição das variáveis foi analisada e as contagens bacterianas foram convertidas para a escala logarítmica. Modelos de medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2011) foram usados para comparar cada média da contagem bacteriana entre as esteiras e linhas de processamento. Um termo de interação entre esteira e momento foi incluído em

todos os modelos para testar a hipótese de que a diferença entre esteiras foi dependente do momento analisado.

Subsequentemente, a análise foi realizada separadamente para cada linha de processamento. Uma estrutura de covariância de simetria composta resultou no melhor ajuste para modelar a correlação entre as medidas repetidas dentro da mesma esteira e linha de processamento. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores-P resultantes de comparações múltiplas.

O teste de Qui-quadrado foi utilizado em análise univariada para identificar fatores associados ao isolamento de *L. monocytogenes*. Posteriormente, um modelo de regressão logística (PROC GLIMMIX, SAS Institute, 2011) foi construído para estimar as chances de isolamento de *L. monocytogenes* entre linhas de processamento, esteiras e momentos. O nível de significância estatística foi definido como 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito da aspersão de água na contaminação por mesófilos

Na Tabela 1 estão dispostas as médias das contagens de micro-organismos mesófilos de amostras superficiais de esteiras lisas e modulares, com e sem o uso de aspersão de água independente da linha de processamento.

Cabe ressaltar que nesta tabela estão contidos os resultados da avaliação em T_1 , T_2 e T_3 , excluindo os obtidos em T_0 , pelo entendimento que neste momento as esteiras se encontravam em condições de higiene muito melhores devido ao procedimento de higiene pré-operacional, pela utilização de água, detergentes e principalmente de sanitizantes.

Para as esteiras lisas, não houve diferença estatística significativa nas contagens obtidas das amostras superficiais na comparação entre esteiras com e sem aspersão ($p=0,94$). Nas esteiras modulares, não foi observada a mesma tendência, sendo que a média nas esteiras higienizadas por aspersão foi significativamente menor que das esteiras não higienizadas ($p<0,001$).

Comparando os tipos de esteiras, as lisas apresentaram resultados significativamente menores quando comparados com as modulares independentemente do tipo de higienização. Portanto, em uma análise global, independente da linha de processamento e do tipo de produto transportado pelas esteiras, verificou-se que as esteiras lisas podem ser consideradas mais higiênicas, quando observadas as contagens de micro-organismos mesófilos.

Tabela 1. População média de micro-organismos mesófilos ($\log \text{UFC}/\text{cm}^2$) em esteiras de quatro linhas de processamento submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água.

Esteira	Aspersão	Média*	N
Lisa	Presente	$1,63 \pm 0,6^A$	240
	Ausente	$1,65 \pm 0,7^A$	240
Modular	Presente	$1,86 \pm 0,8^B$	240
	Ausente	$2,07 \pm 0,6^C$	239

Valores seguidos de letras distintas indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

* Média do somatório dos resultados obtidos para tempo de amostragem T_1 , T_2 e T_3 .

Na Tabela 2 estão dispostos os resultados individuais das quatro linhas de processamento para a contagem de mesófilos.

Para as esteiras lisas, na linha A as contagens não apresentaram diferença estatística significativa quando comparado o tipo de higienização ($p=1$), ou seja, o uso de aspersão de água não apresentou efeito superior na remoção da contaminação, ressaltando-se que as condições encontradas em ambas esteiras eram semelhantes em relação aos produtos (coxa com sobrecoxa) transportados.

Tabela 2. População média de micro-organismos mesófilos (log UFC/cm²) em esteiras submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água de quatro linhas de processamento (A, B, C e D).

Linha	Esteiras Lisas		Esteiras Modulares	
	Com aspersão	Sem aspersão	Com aspersão	Sem aspersão
A	1,53 ± 0,4* ^{BC}	1,52 ± 0,5 ^{BC}	2,26 ± 0,4 ^{EF}	2,27 ± 0,4 ^{EF}
B	1,91 ± 0,5 ^{CDE}	2,43 ± 0,4 ^F	1,90 ± 0,6 ^{CDE}	2,45 ± 0,5 ^F
C	2,03 ± 0,4 ^{DEF}	0,96 ± 0,5 ^A	2,15 ± 0,8 ^{EF}	2,18 ± 0,4 ^{EF}
D	1,04 ± 0,4 ^A	1,69 ± 0,3 ^{CD}	1,11 ± 0,7 ^{AB}	1,37 ± 0,2 ^{AB}

Valores seguidos de letras distintas indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

* Média do somatório dos resultados obtidos para tempo de amostragem T₁, T₂ e T₃.

Nas linhas B e D, o processo de higienização se mostrou eficaz na redução das contagens de mesófilos ($p<0,001$).

Na linha B, além do emprego da aspersão, as menores contagens podem ser justificadas pelo tipo de produto transportado pois o mesmo não apresentava pele o que reduz a contaminação do corte e consequentemente a menor transferência de micro-organismos para a esteira.

Com relação ao tipo de corte das esteiras, nas conversas iniciais com os responsáveis pelos estabelecimentos buscou-se trabalhar em esteiras onde eram transportados cortes cujos níveis de contaminação inicial fossem semelhantes. Porém, devido às condições operacionais relacionados aos estabelecimentos, não foi possível realizar uma perfeita padronização.

Em todas as linhas de processamento e tipos de esteiras avaliadas, os cortes processados nas superfícies, tais como coxa, sobrecoxa, asas, meio das asas e peito, eram cortes que continham a pele, com exceção da linha B onde

em uma esteira lisa era processado peito sem pele e na outra coxinha da asa e meio da asa com pele.

No entanto, a pele não foi fator determinante para justificar o melhor desempenho da aspersão na higienização das esteiras lisas na linha D. Neste estabelecimento, os produtos que eram transportados eram os mesmos (peito com pele) e o uso da água foi efetivamente melhor na redução da contaminação.

Em uma análise visual da esteira, era nítido que a água participava de forma eficiente na remoção de resíduos, pois sua pressão era constante e forte. Além da variável água, um segundo fator também pode ter concorrido para este melhor resultado: a forma de caída dos cortes nas esteiras.

Na esteira lisa com aspersão de água, os cortes que entravam para serem processados vinham de uma calha transversal à esteira, assim, o corte que cai nesta esteira chocava-se contra a parede lateral e não deslizava. Já na esteira sem aspersão, a entrada do produto era por meio de uma calha localizada no mesmo sentido da esteira, o que fazia com que o corte deslizasse no momento da caída.

A forma de entrada do produto resultava em um menor ou maior deslizamento do peito na esteira aumentando a transferência de resíduos e contaminantes nesta superfície, característica que era observada durante a realização da amostragem das esteiras.

Ao contrário, na linha C, a utilização da água teve um efeito negativo na contaminação das superfícies, pois nas esteiras higienizadas por aspersão a média das contagens foi significativamente maior quando comparadas às não higienizadas.

Este fato pode ser justificado pelas condições diferenciadas encontradas nestas esteiras, pois as lisas com aspersão com as maiores contagens apresentavam uma maior circulação de produtos e, ao mesmo tempo a linha contava com muitos funcionários responsáveis pelo refile dos cortes de coxa com sobrecoxa.

Com relação às esteiras modulares, nas linhas A, C e D não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) quando comparados os efeitos da utilização da aspersão no processo de higienização.

A linha B foi a única que apresentou resultado significativo ($p < 0,001$) quanto à utilização ou não da aspersão de água no processo de higiene operacional das esteiras, ao contrário das demais linhas.

Nesta linha foi observada uma situação bem semelhante à ocorrida nas esteiras lisas da linha D. Os produtos transportados nas esteiras eram exatamente os mesmos, no entanto, o design do equipamento no momento da entrada dos produtos na esteira parece ter influenciado os resultados.

Nesta linha, a esteira modular com aspersão de água apresentava um anteparo de aço inoxidável que diminuía a tensão da queda do produto durante sua entrada na esteira. Ao contrário, os produtos que caíam nas esteiras modulares sem aspersão que não continham esse anteparo sofriam uma queda abrupta na esteira e conseqüentemente uma força física auxiliava na maior transferência de resíduos e micro-organismos para estas esteiras.

Ao serem comparadas as médias obtidas nas esteiras lisas e modulares, foi possível observar que o tipo de esteiras pode influenciar no processo de higienização, resultando em menores ou maiores contagens de micro-organismos mesófilos, fato que aconteceu em três linhas de processamento.

Na linha A, a média das contagens nas esteiras lisas com aspersão foi significativamente ($p < 0,001$) menor quando comparada com a média das esteiras modulares, fato que pode ser observado também quando compararam-se os dois tipos de esteiras sem aspersão de água ($p < 0,001$).

Cabe ressaltar, que mesmo não apresentando o mesmo produto para comparação entre esteiras, em todos os casos, os cortes de frango apresentavam pele. Nas linhas C e D, as esteiras lisas sem aspersão também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,001$) quando comparadas com as modulares. Na linha C, a contagem na lisa foi menor que na modular e na linha D a contagem na modular foi menor que na lisa.

Estas diferenças podem ser explicadas pelas características das esteiras. Esteiras modulares são consideradas muito versáteis, pois são desenhadas para proporcionar um transporte de cortes na horizontal ou em curvas, permitindo o encaminhamento destes para outros setores, o que agiliza o processo de industrialização e permite adaptações e adequações ao espaço das linhas de processamento.

Para que estes objetivos sejam atingidos, este tipo de esteira é constituída de um conjunto de peças que se encaixam umas às outras, sendo possível dimensionar a esteira como desejado.

Apesar do fino ajuste entre os encaixes de uma esteira modular, as reentrâncias permitem o acúmulo de material orgânico e micro-organismos, dificultando o processo de higienização contínua o que pode ser a explicação mais plausível para a observação das maiores contagens de mesófilos encontradas após a amostragem das superfícies modulares por meio do *swabs*.

No entanto, na linha B, o tipo de esteira não influenciou na média das contagens, pois os resultados tanto nas lisas quanto nas modulares não apresentaram diferença estatística significativa ($p=1$). A mesma situação aconteceu nas linhas C e D, onde as esteiras higienizadas não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$).

Das linhas avaliadas, a D foi a que apresentou as menores contagens de mesófilos quando testada a mesma superfície e tipo de higienização, com exceção das esteiras lisas sem aspersão da linha C, onde foram obtidas as menores contagens de mesófilos.

Estas baixas contagens na linha C, podem ser justificadas pelo baixo volume de produtos que eram transportados pela esteira, refletindo numa menor transferência de micro-organismos do corte para a superfície. E a linha D era a que apresentava os equipamentos e superfícies em melhores condições.

A coleta de amostras nesta sala foi realizada poucos meses após a sua inauguração, estando as superfícies ainda em excelente estado de conservação. Este fator pode explicar as menores contagens obtidas neste estabelecimento, tanto para as esteiras lisas quanto para as modulares.

A utilização contínua de superfícies causa o desgaste das esteiras que leva a formação de pequenas ranhuras e deformidades. Uma vez presentes estas ranhuras, a higienização pode ser prejudicada, pois a matéria orgânica se adere às deformidades o que dificulta a sua remoção.

Ainda com relação ao tempo de uso dos equipamentos das linhas de processamento, constatou-se que em algumas esteiras a higienização contínua sob pressão exercida pelo chuveiro não era um parâmetro padronizado, de tal

modo que em alguns momentos a pressão diminuía prejudicando a retirada da matéria orgânica, ocorrência que era mais frequentemente observada nas linhas B e C.

Este fato pode ser consequência da ausência de parâmetros legais, uma vez que a Portaria 210 exige apenas que as esteiras condutoras de carcaças e cortes devem prever sistemas de lavagem contínua, não especificando a pressão que deve ser utilizada (BRASIL, 1998).

Na Tabela 3, estão dispostos os resultados da média das contagens de micro-organismos mesófilos de amostras superficiais de esteiras lisas e modulares, com e sem a utilização de aspersão de água avaliadas em quatro momentos de coletas (T_0 , T_1 , T_2 e T_3).

Avaliando a média das quatro linhas de processamento (ABCD) e individualmente, as médias das contagens de mesófilos em T_0 foram significativamente ($p > 0,05$) menores que nos demais tempos avaliados, com exceção da linha B, onde as contagens não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre T_0 , T_1 , T_2 e T_3 , independentemente do tipo de higienização (com ou sem aspersão de água) e esteira (lisa ou modular).

Neste caso, as contagens iniciais já eram altas, numericamente maiores que as detectadas nas demais linhas de processamento, reflexo de uma higienização pré-operacional deficiente que permitiu a permanência de matéria orgânica e consequentemente de micro-organismos nas superfícies das esteiras.

Atualmente, a legislação brasileira não estabelece nenhum padrão microbiológico para a avaliação da higiene pré-operacional de superfícies em matadouros de aves. Apesar de revogada em 2006, a Decisão 471 da Comunidade Europeia (EC, 2001) estabelecia como aceitáveis contagens de até 10 UFC/cm² de mesófilos (1 log) e 1 UFC/cm² de enterobactérias (0 log).

Tomando como base estes parâmetros, é possível constatar que na linha B, todas as esteiras avaliadas em T_0 apresentaram-se fora deste padrão.

Na média ABCD, não houve diferença significativa na comparação entre higienização das esteiras lisas quando avaliadas no mesmo momento, resultado observado também nas esteiras modulares.

Tabela 3. População média de micro-organismos mesófilos (log UFC/cm²) em esteiras de quatro linhas de processamento submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água coletadas em quatro diferentes momentos (T₀, T₁, T₂ e T₃).

Linha	Momento	Esteiras Lisas		Esteiras Modulares	
		Com aspersão	Sem aspersão	Com aspersão	Sem aspersão
ABCD	T ₀	0,18 ± 1,3 ^A	0,15 ± 1,2 ^A	0,68 ± 1,4 ^B	0,66 ± 1,5 ^B
	T ₁	1,59 ± 0,5 ^C	1,65 ± 0,7 ^{CD}	1,67 ± 0,7 ^{CDE}	2,01 ± 0,5 ^{EFG}
	T ₂	1,64 ± 0,6 ^{CD}	1,57 ± 0,7 ^C	1,80 ± 0,8 ^{CDEF}	1,98 ± 0,6 ^{DEFG}
	T ₃	1,65 ± 0,5 ^{CD}	1,73 ± 0,6 ^{CDE}	2,10 ± 0,8 ^{FG}	2,21 ± 0,6 ^G
A	T ₀	-0,78 ± 0,6 ^A	-0,36 ± 0,9 ^A	0,45 ± 1,2 ^{AB}	1,05 ± 1,3 ^{BC}
	T ₁	1,65 ± 0,3 ^{CD}	1,64 ± 0,4 ^{CD}	2,19 ± 0,4 ^{DE}	2,29 ± 0,4 ^E
	T ₂	1,50 ± 0,4 ^C	1,35 ± 0,5 ^C	2,32 ± 0,4 ^E	2,19 ± 0,4 ^{DE}
	T ₃	1,45 ± 0,4 ^C	1,56 ± 0,4 ^C	2,29 ± 0,5 ^E	2,33 ± 0,5 ^E
B	T ₀	1,64 ± 0,6 ^A	1,95 ± 0,3 ^{AB}	2,02 ± 0,4 ^{ABC}	2,30 ± 0,5 ^{BC}
	T ₁	1,72 ± 0,5 ^A	2,39 ± 0,2 ^{BC}	1,75 ± 0,6 ^{AB}	2,35 ± 0,4 ^{BC}
	T ₂	2,05 ± 0,5 ^{AB}	2,45 ± 0,5 ^{BC}	1,96 ± 0,6 ^{AB}	2,43 ± 0,5 ^{BC}
	T ₃	1,96 ± 0,4 ^{AB}	2,46 ± 0,5 ^{BC}	2,00 ± 0,6 ^{AB}	2,57 ± 0,6 ^C
C	T ₀	0,84 ± 0,9 ^{ABC}	-0,01 ± 0,6 ^A	1,14 ± 1,2 ^{CD}	0,21 ± 1,1 ^{AB}
	T ₁	1,93 ± 0,4 ^{DE}	0,92 ± 0,8 ^{BC}	1,84 ± 0,7 ^{DE}	2,09 ± 0,3 ^{EFG}
	T ₂	2,07 ± 0,4 ^{EFG}	0,87 ± 0,3 ^{BC}	1,95 ± 0,7 ^{DEF}	1,95 ± 0,4 ^D
	T ₃	2,08 ± 0,4 ^{EFG}	1,08 ± 0,3 ^C	2,65 ± 0,6 ^G	2,47 ± 0,4 ^{FG}
D	T ₀	-0,97 ± 0,0 ^A	-0,96 ± 0,1 ^A	-0,86 ± 0,3 ^A	-0,94 ± 0,1 ^A
	T ₁	1,06 ± 0,5 ^{BCD}	1,64 ± 0,3 ^E	0,92 ± 0,6 ^B	1,31 ± 0,2 ^{BCD}
	T ₂	0,94 ± 0,3 ^{BC}	1,60 ± 0,3 ^E	0,96 ± 0,5 ^{BC}	1,35 ± 0,2 ^{CD}
	T ₃	1,12 ± 0,3 ^{BCD}	1,83 ± 0,3 ^E	1,45 ± 0,8 ^{DE}	1,46 ± 0,2 ^{DE}

Valores seguidos de letras distintas indicam diferença significativa (P < 0,05) quando avaliada a mesma linha de processamento.

Estes mesmo resultados foram observados por Soares et al. (2014), que não encontraram diferença significativa entre o processo de higienização de esteiras lisas quando avaliadas num mesmo momento para a contagem de mesófilos.

Analisando individualmente as linhas de processamento, pode-se notar que a partir de T₁, em alguns momentos das linhas B, C e D, houve diferença significativa (p>0,05) que foi dependente da higiene operacional utilizada.

Com exceção da linha A, onde as contagens a partir de T₁ nas esteiras lisas com aspersão de água não apresentaram diferença significativa (p<0,05)

quando comparadas com as sem água, o mesmo acontecendo com os valores em todos os tempos, tipo de higiene operacional e esteiras desta linha.

Na linha B, as esteiras lisas avaliadas em T_1 com aspersão apresentaram contagens significativamente menores quando comparadas com as que não foram higienizadas, fato que não ocorreu nos demais tempos. Nas esteiras modulares com aspersão, as amostras avaliadas em T_3 foram menores quando comparadas com as esteiras sem água, não sendo observada esta mesma diferença nos demais tempos avaliados.

Na linha C, as esteiras lisas sem aspersão em T_1 , T_2 e T_3 apresentaram contagens menores quando comparadas com as esteiras com aspersão, já nas modulares não houve diferença entre a utilização ou não da aspersão de água ao longo do turno de trabalho.

Na linha D, as esteiras lisas com aspersão em T_1 , T_2 e T_3 apresentaram contagens menores quando comparadas com as esteiras não higienizadas. Nas modulares, não foi observada diferença estatística significativa entre o tipo de higienização.

Quando os resultados foram avaliados ao longo dos tempos observou-se que, na maioria dos casos, as contagens no início do dia eram significativamente menores comparadas às obtidas ao longo do dia, o que era um resultado esperado já que a coleta em T_0 era realizada logo após a higienização pré-operacional das esteiras que, entre outros procedimentos utilizava sanitizantes com o objetivo de eliminar os micro-organismos, preparando as superfícies para o início do processo de industrialização dos cortes.

Com o passar das horas e o aumento de fluxo de passagem de produtos nas esteiras, as contagens aumentaram independente do processo de higienização, como observado no incremento da contaminação superficial de T_0 para T_1 , T_2 e T_3 , em grande parte das esteiras avaliadas.

Soares et al. (2014) observaram que as contagens obtidas logo após a higienização pré-operacional foram significativamente menores que as observadas durante o dia de trabalho apenas em esteiras higienizadas com aspersão. Para as esteiras não higienizadas, a contaminação por mesófilos não apresentou diferença estatística significativa ao longo do dia.

Outra tendência observada foi a manutenção constante da contaminação de mesófilos ao longo da coleta durante o dia de trabalho, pois de uma forma geral, em todas as linhas de processamento e esteiras não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta T_1 , T_2 e T_3 , independente do uso de aspersão de água para a higienização das esteiras.

A princípio, esperava-se que somente nas esteiras com o uso de aspersão de água fosse possível observar essa situação, no entanto, mesmo sem o uso da água foi observada que a contaminação manteve-se constante e, que não houve um incremento da contaminação ao longo dos tempos de coleta. Avaliando sobre este aspecto, a ausência de aspersão de água não exerceu influência sobre a contaminação ao longo do dia.

5.2 Efeito da aspersão de água na contaminação por enterobactérias

Na Tabela 4, estão dispostas médias das contagens de enterobactérias independente das linhas de processamento. Da mesma forma que para mesófilos, os resultados apresentados nesta tabela são as médias dos tempos T_1 , T_2 e T_3 .

Tabela 4. População média de enterobactérias (log UFC/cm²) em esteiras de quatro linhas de processamento submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água

Esteira	Aspersão	Média*	N
Lisa	Presente	$0,59 \pm 0,5^A$	239
	Ausente	$0,76 \pm 0,7^B$	239
Modular	Presente	$0,89 \pm 0,8^C$	240
	Ausente	$1,32 \pm 0,6^D$	237

Valores seguidos de letras distintas indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

* Média do somatório dos resultados obtidos para tempo de amostragem T_1 , T_2 e T_3 .

O processo de higienização influenciou nas contagens obtidas nas esteiras lisas, pois as com aspersão apresentaram resultados menores quando comparadas com as esteiras onde não se utilizou aspersão ($p < 0,001$), o mesmo sendo observado nas esteiras modulares.

Comparando os tipos de esteiras, as lisas apresentaram resultados melhores quando comparados com as esteiras modulares, independentemente do tipo de higienização ($p < 0,001$).

Na Tabela 5, estão dispostos os resultados da média das contagens de enterobactérias de amostras superficiais de esteiras lisas e modulares, com e sem o uso de aspersão de água das quatro linhas de processamento.

Para as esteiras lisas, somente na linha A o processo de higienização não apresentou resultado significativo, seguindo a mesma tendência observada para a contagem de mesófilos. O padrão observado para mesófilos manteve-se também nas demais linhas.

Nas linhas B e D o processo de higienização se mostrou eficiente, pois as contagens nas esteiras sem aspersão foram maiores que naquelas com aspersão, assim como ocorrido nas contagens de mesófilos.

Na linha C o processo se inverteu, as contagens nas esteiras com aspersão foram maiores que nas sem aspersão, resultado este também observado nas contagens de micro-organismos mesófilos e, justificado pelo maior volume de produtos que eram transportados e a manipulação intensa dos produtos por parte dos funcionários nesta esteira.

Tabela 5. População média de enterobactérias (log UFC/cm²) em esteiras submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água de quatro linhas de processamento (A, B, C e D).

Linha	Esteiras Lisas		Esteiras Modulares	
	Com água	Sem água	Com água	Sem água
A	0,82 ± 0,4* ^{CD}	0,81 ± 0,6 ^{CD}	1,65 ± 0,7 ^E	1,73 ± 0,6 ^E
B	0,42 ± 0,4 ^{BC}	1,49 ± 0,3 ^E	0,92 ± 0,5 ^D	1,52 ± 0,3 ^E
C	0,95 ± 0,5 ^D	-0,12 ± 0,5 ^A	0,81 ± 0,6 ^{CD}	1,42 ± 0,5 ^E
D	0,16 ± 0,4 ^B	0,88 ± 0,4 ^D	0,17 ± 0,6 ^B	0,62 ± 0,4 ^{CD}

Valores seguidos de letras distintas indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

* Média do somatório dos resultados obtidos para tempo de amostragem T₁, T₂ e T₃.

Nas esteiras modulares, da mesma forma que nas lisas, apenas na linha A o processo de higienização com aspersão não se mostrou eficiente, pois as contagens não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Nas demais linhas, o processo de higienização apresentou diferença estatística

significativa ($p < 0,05$), com médias da contagem de enterobactérias menores nas esteiras com aspersão em relação às esteiras sem aspersão. Fato este que não havia sido observado nas linhas C e D nas contagens de micro-organismos mesófilos (Tabela 2).

Comparando esteiras lisas com as modulares, podemos observar que o tipo de esteiras influenciou no processo de higienização, resultado observado nas linhas A, B e C.

Na linha A, as esteiras lisas com aspersão apresentaram contagens menores que as modulares que passaram pelo mesmo processo de higienização, resultado observado também nas esteiras lisas e modulares sem aspersão.

Na linha B, a diferença foi observada apenas nas esteiras com aspersão, onde as lisas apresentaram menores contagens. Na linha C, esta diferença foi observada nas esteiras sem aspersão.

Na Tabela 6 estão dispostos os resultados da média das contagens de enterobactérias de amostras superficiais de esteiras lisas e modulares, com e sem a utilização de aspersão de água avaliado em quatro momentos de coletas (T_0 , T_1 , T_2 e T_3).

Avaliando individualmente cada linha de processamento bem como a média (ABCD), podemos observar que as contagens em T_0 foram significativamente menores que nos demais tempos, com exceção das esteiras lisas com aspersão e modulares com e sem aspersão, todas pertencentes à linha B.

Avaliando a média das quatro linhas de processamento (ABCD), podemos observar que nas esteiras lisas, o processo de higienização com aspersão não influenciou nas contagens obtidas avaliadas no mesmo momento, semelhante ao que foi observado por Soares et al. (2014).

Nas esteiras modulares, somente nas amostras avaliadas em T_0 que o processo de aspersão não influenciou nas contagens; a partir de T_1 , a aspersão exerceu influência nas contagens encontradas, sendo que as médias nas esteiras com aspersão foram significativamente menores que nas esteiras sem aspersão.

Na linha A, não houve diferença entre o tipo de higienização em nenhum dos momentos avaliados nas esteiras lisas. Nas esteiras modulares, a

diferença foi observada apenas em T₀, onde as contagens neste momento para as esteiras com aspersão foram significativamente menores quando comparadas com as sem aspersão, sendo que nos demais momentos não foi observada esta diferença.

Tabela 6. População média de enterobactérias (log UFC/cm²) em esteiras de quatro linhas de processamento submetidas ou não à higienização contínua com aspersão de água coletadas em quatro diferentes momentos (T₀, T₁, T₂ e T₃).

Linha	Momento	Esteiras Lisas		Esteiras Modulares	
		Com água	Sem água	Com água	Sem água
ABCD	T ₀	-0,65 ± 0,5 ^A	-0,53 ± 0,8 ^A	-0,36 ± 0,7 ^{AB}	-0,01 ± 1,2 ^B
	T ₁	0,52 ± 0,6 ^C	0,80 ± 0,8 ^{CDE}	0,80 ± 0,8 ^{CDE}	1,27 ± 0,6 ^{FG}
	T ₂	0,69 ± 0,6 ^{DE}	0,69 ± 0,7 ^{CDE}	0,88 ± 0,8 ^{DE}	1,25 ± 0,6 ^{FG}
	T ₃	0,55 ± 0,4 ^{CD}	0,81 ± 0,7 ^{CDE}	0,98 ± 0,8 ^{EF}	1,44 ± 0,7 ^G
A	T ₀	-1,00 ± 0,0 ^A	-0,78 ± 0,7 ^A	-0,55 ± 0,7 ^A	0,38 ± 1,2 ^B
	T ₁	1,00 ± 0,3 ^{BC}	1,01 ± 0,6 ^{BC}	1,61 ± 0,6 ^{CD}	1,86 ± 0,5 ^D
	T ₂	0,85 ± 0,4 ^B	0,58 ± 0,5 ^B	1,59 ± 0,8 ^{CD}	1,55 ± 0,6 ^{CD}
	T ₃	0,63 ± 0,3 ^B	0,83 ± 0,5 ^B	1,76 ± 0,8 ^D	1,80 ± 0,6 ^D
B	T ₀	-0,13 ± 0,3 ^A	0,56 ± 0,5 ^{BC}	0,60 ± 0,4 ^C	1,22 ± 0,8 ^{DEF}
	T ₁	0,07 ± 0,4 ^{AB}	1,47 ± 0,3 ^F	0,87 ± 0,5 ^{CD}	1,37 ± 0,3 ^{EF}
	T ₂	0,63 ± 0,4 ^C	1,47 ± 0,4 ^F	0,99 ± 0,4 ^{CDE}	1,57 ± 0,3 ^F
	T ₃	0,57 ± 0,3 ^C	1,54 ± 0,2 ^F	0,88 ± 0,6 ^{CD}	1,63 ± 0,3 ^F
C	T ₀	-0,45 ± 0,7 ^{AB}	-0,88 ± 0,3 ^A	-0,52 ± 0,5 ^{AB}	-0,64 ± 0,5 ^{AB}
	T ₁	0,85 ± 0,5 ^{CDE}	-0,04 ± 0,6 ^B	0,60 ± 0,8 ^C	1,27 ± 0,4 ^{EF}
	T ₂	1,15 ± 0,6 ^{DE}	-0,22 ± 0,4 ^B	0,74 ± 0,4 ^{CD}	1,23 ± 0,5 ^{DEF}
	T ₃	0,87 ± 0,4 ^{CDE}	-0,09 ± 0,5 ^B	1,09 ± 0,6 ^{CDE}	1,76 ± 0,5 ^F
D	T ₀	-1,00 ± 0,0 ^A	-1,00 ± 0,0 ^A	-0,96 ± 0,1 ^A	-1,00 ± 0,0 ^A
	T ₁	0,17 ± 0,4 ^{BC}	0,75 ± 0,5 ^E	0,10 ± 0,5 ^B	0,61 ± 0,4 ^{DE}
	T ₂	0,15 ± 0,4 ^B	0,91 ± 0,3 ^E	0,21 ± 0,8 ^{BCD}	0,67 ± 0,3 ^E
	T ₃	0,15 ± 0,4 ^B	0,99 ± 0,4 ^E	0,20 ± 0,5 ^{BCD}	0,58 ± 0,4 ^{CDE}

Valores seguidos de letras distintas indicam diferença significativa (P < 0,05) quando avaliado a mesma linha de processamento.

A partir de T₁ na linha D, o processo de higienização nas esteiras lisas apresentou resultado significativo, pois as contagens foram significativamente menores quando a higienização foi realizada. Nas esteiras modulares, este resultado foi observado apenas nas esteiras avaliadas em T₁ e T₂.

De forma semelhante aos mesófilos, a contaminação de enterobactérias manteve-se constante ao longo dos turnos de trabalho, pois de uma forma geral, em todas as linhas de processamento não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta T_1 , T_2 e T_3 , independente do uso de aspersão de água ou tipo das esteiras.

Num estudo semelhante, a contagem de enterobactérias não apresentou diferença estatística ao longo do período avaliado (SOARES et al., 2014).

5.3 Efeito da aspersão de água na contaminação por *L. monocytogenes*

Na Tabela 7 encontra-se o número de isolados das diversas espécies do gênero *Listeria* isoladas nas linhas de processamento avaliadas. Das 640 amostras avaliadas, 314 (49,06%) foram positivas para uma (237), duas (73) ou até três (4) espécie do gênero, sendo *L. innocua* a mais frequente (29,21%), seguida por *L. monocytogenes* (22,19%) e *L. welshimeri* (9,06%).

Tabela 7. Espécies de *Listeria* isoladas de amostras de superfícies de esteiras lisas e modulares, com e sem aspersão de água de quatro linhas de processamento.

<i>Listeria</i>	A (n=160)	B (n=160)	C (n=160)	D (n=160)	Total
<i>innocua</i>	35	81	71	0	187
<i>monocytogenes</i>	25	52	63	2	142
<i>welshimeri</i>	0	49	0	9	58

Chiarini et. al (2007), ao avaliarem a contaminação por *Listeria* em equipamentos, utensílios e superfícies que entram ou não em contato com alimentos em matadouros de aves, observaram que *L. innocua* foi a espécie predominante em todos os tipos de amostras analisadas, incluindo esteiras condutoras de salas de cortes. Os autores atribuem que a maior frequência desta espécie, quando comparada com as demais do gênero, se deve ao fato de *L. innocua* poder estar mais adaptada ao ambiente onde foi realizado o estudo.

A alta frequência de *L. innocua* pode ser considerado um dado preocupante, pois alguns autores ressaltam que a presença de espécies de *Listeria*, sobretudo *L. innocua*, pode indicar a presença de *L. monocytogenes* (SLADE, 1992).

Na Tabela 8 estão dispostas as frequências de isolamento de *L. monocytogenes* nas esteiras lisas e modulares.

Das linhas de processamento avaliadas, a D foi a que apresentou a menor frequência de isolamento. Como mencionado anteriormente, os equipamentos desta linha tinham pouco tempo de uso, o que certamente refletiu tanto na menor frequência de isolamento do patógeno quanto nas menores contagens dos micro-organismos indicadores avaliados.

A linha C foi a que apresentou a maior frequência de isolamento seguido pela linha B. O volume de abate pode ter influenciando para contaminação das superfícies da linha B, porém, na linha C esta justificativa não é o fator principal responsável pela contaminação observada, pois esta linha era a que tinha menor volume de abate.

Talvez a hipótese apresentada para os grupos de micro-organismos indicadores não possa ser aplicada igualmente para *L. monocytogenes*, inclusive porque a análise realizada foi a presença e ausência e não a quantificação, que foi feita para os indicadores mesófilos e enterobactérias.

Chiarini et al. (2007) avaliaram a recuperação e disseminação de *L. monocytogenes* em produtos, superfícies que entravam ou não em contato com alimentos e água de duas plantas de abate de aves no Brasil.

Na planta de evisceração automática a recuperação do patógeno foi de 20,1%, sendo que a recuperação do patógeno em superfícies que entram em contato com alimentos foi de 19,6% e, na planta manual, *L. monocytogenes* foi recuperada em 16,4% do total de amostras avaliadas e nas superfícies que entram em contato com o alimento a porcentagem de positivos foi de 17,3%.

Dias (2008) em estudo sobre a persistência de cepas de *L. monocytogenes* em uma linha de abate industrial de frangos em matadouro localizado em São Paulo, isolou o patógeno em 15,7% do total de amostras avaliadas, destes, 22,5% foram amostras positivas de superfícies que entravam em contato com alimentos, incluindo esteiras condutoras.

Tabela 8. Frequência de isolamento de *L. monocytogenes* em amostras de esteiras lisas e modulares com e sem aspersão de água.

Esteiras lisas e modulares com e sem aspersão de água.				
Amostras	Número de positivas	%	N	Valor de P
Por linha				
A	25	15,63	160	<0,0001
B	52	32,5	160	
C	63	39,38	160	
D	2	1,25	160	
Por esteira				
Lisa com aspersão	36	22,5	160	0,0005
Lisa sem aspersão	50	31,25	160	
Modular com aspersão	19	11,88	160	
Modular sem aspersão	37	23,13	160	
Por momento				
T ₀	17	10,63	160	0,0005
T ₁	41	25,63	160	
T ₂	38	23,75	160	
T ₃	46	28,75	160	

Das esteiras avaliadas, a que apresentou a menor frequência foi a modular com aspersão seguida da lisa com aspersão. Este resultado demonstra que a aspersão com água exerceu influência na presença de *L. monocytogenes*.

Contudo, mesmo observando que os resultados foram melhores quando utilizou-se a aspersão, a higienização não conseguiu reduzir completamente a contaminação, resultando num elevado número de amostras superficiais positivas.

Quando se avaliou a frequência por momentos, o T₀ foi o que apresentou as menores frequências, resultado que já era esperado, pois este era o momento em que a esteira estava pronta para iniciar o processamento dos cortes.

Logo após o início do processamento, a passagem dos produtos pelas superfícies das esteiras, levou à contaminação, como pode ser observado no incremento do número de isolamentos de *L. monocytogenes* que se manteve constante ao longo do processo de industrialização.

Independente da linha de processamento, tipo de esteira, higienização e tempo avaliados, evidenciou-se um número significativo de amostras positivas para o referido patógeno, indicando a permanência de *L. monocytogenes* mesmo após os procedimentos de higienização utilizados antes do início dos trabalhos (higienização pré-operacional) e durante a industrialização para a obtenção dos cortes cárneos (higienização operacional), o que pode indicar a possível presença de biofilmes bacterianos com resistência às técnicas usuais de higienização utilizadas pelos estabelecimentos.

Adicionalmente, a presença de *L. monocytogenes* indicou que as esteiras foram fontes potenciais de contaminação cruzada para os produtos que são transportados nestes equipamentos.

Na Tabela 9 estão dispostos a Razão de Chance (*Odds Ratio* - OR) e respectivos intervalos de confiança da comparação entre os diferentes tipos de esteiras e tipo de higienização.

Quando foram avaliados os resultados independentemente das linhas de processamento (valores em ABCD), foi possível observar que nas esteiras lisas, a chance de isolamento do patógeno foi significativamente maior nas esteiras sem aspersão (OR=0,569; IC=0,325-0,998), o mesmo acontecendo com as esteiras modulares (OR=2,533; IC=1,323-4,851), mostrando que a aspersão exerceu um efeito sobre o isolamento de *L. monocytogenes* nas superfícies avaliadas.

Na comparação entre os dois tipos de esteiras, a chance de isolamento nas esteiras lisas com água foi maior que nas modulares que passaram pelo mesmo processo de higienização (OR=2,426; IC=1,265-4,654), ao contrário das esteiras lisas e modulares sem higienização com água onde o resultado obtido não foi significativo.

Tabela 9. Razão de chance (OR) e intervalo de confiança (IC) da pesquisa de *L. monocytogenes* em amostras de esteiras lisas e modulares com e sem aspersão de água.

Linha	Frequência nas esteiras				OR	IC 95%	
	Lisas (%)		Modulares (%)				
ABCD	22,5	31,25	11,88	23,13			
	com água	sem água			0,569	0,325	0,998
			com água	sem água	2,533	1,323	4,851
	com água		com água		2,426	1,265	4,654
		sem água		sem água	1,683	0,962	2,944
A	10,0	40,0	7,5	5,0			
	com água	sem água			0,167	0,049	0,565
			com água	sem água	0,649	0,101	4,170
	com água		com água		1,370	0,283	6,639
		sem água		sem água	12,667	2,639	60,789
B	22,5	60,0	17,5	30,0			
	com água	sem água			0,194	0,072	0,517
			com água	sem água	2,020	0,695	5,877
	com água		com água		1,369	0,450	4,158
		sem água		sem água	3,500	1,376	8,900
C	57,5	25,0	17,5	57,5			
	com água	sem água			4,059	1,556	10,588
			com água	sem água	6,378	2,262	17,986
	com água		com água		6,378	2,262	17,986
		sem água		sem água	0,246	0,094	0,643
D	0	0	5,0	0			
	com água	sem água			1,000	<0,001	-
			com água	sem água	<0,001	<0,001	-
	com água		com água		<0,001	<0,001	-
		sem água		sem água	1,000	<0,001	-

Pela presença de reentrâncias nas esteiras modulares, esperava-se isolar o patógeno em maior quantidade nestas superfícies, contudo observou-se o contrário, as esteiras lisas apresentaram uma quantidade maior de amostras positivas (Tabela 8).

Esse maior isolamento pode estar relacionado à quantidade de água residual nas esteiras lisas, uma vez que formava-se uma lâmina de água na superfície que pode ter influenciado na maior facilidade de recuperação do

patógeno, o que não foi observado nas esteiras modulares, pois a presença das reentrâncias permitiu a drenagem da água por entre os encaixes não ocorrendo acúmulo de água nesta superfície.

Uma segunda hipótese para explicar alta frequência de *L. monocytogenes* nas esteiras lisas é a competição com outros micro-organismos. Como observado nas Tabelas 1 e 4, as esteiras modulares apresentaram maiores contagens de micro-organismos mesófilos e enterobactérias que por sua vez apresentaram frequências menores para *L. monocytogenes*. Estes resultados podem indicar uma dificuldade na competição de *L. monocytogenes* quando presente em um ambiente com outros micro-organismos (SLADE, 1992; VELUZ et. al, 2012).

Uma terceira hipótese pode estar relacionada às características do material das esteiras. No estudo conduzido por Veluz et. al (2012) sobre a capacidade de adesão de *L. monocytogenes* em diferentes tipos de esteiras e ao longo de 48 h, foi observado uma adesão maior do patógeno nas esteiras de poliuretano (esteiras lisas) em relação às de polipropileno (esteiras modulares) quando ambas apresentavam-se higienizadas.

No entanto, a avaliação da capacidade de adesão do patógeno em superfícies que haviam sido rinsadas com frango variou ao longo de 48 h de estudo. E não foram observadas diferenças significativas entre esteiras de poliuretano e polipropileno nos tempos de 1, 6 e 48 h.

Com relação à OR da linha A, as esteiras lisas sem aspersão apresentaram uma chance de isolamento maior quando comparadas com as esteiras com aspersão (OR=0,167; IC=0,049-0,565), fato que não foi observado nas modulares.

Na comparação entre os tipos de esteiras, as lisas sem aspersão de água apresentaram chance de isolamento significativamente maior do patógeno quando comparadas com as modulares sem aspersão (OR=12,667; IC=2,639-60,789), o que não foi observado nas esteiras lisas e modulares com aspersão.

Tendência semelhante foi observada na linha B. Nas lisas a chance de isolamento foi maior nas esteiras sem aspersão de água (OR=0,194; IC=0,072-0,517) não sendo observada diferença significativa nas modulares. Quando comparadas os tipos de esteiras, a chance de isolamento foi maior nas esteiras

lisas sem aspersão de água quando comparadas com as modulares não higienizadas (OR=3,5; IC=1,376-8,9). Para as esteiras lisas e modulares com aspersão a diferença não foi significativa.

De modo geral, nas linhas A e B foi observado uma maior frequência de *L. monocytogenes* nas esteiras lisas sem aspersão de água. No caso da linha A, o produto transportado nestas esteiras era o mesmo, coxa com sobrecoxa, e as condições muito semelhantes de volume de abate, portanto a água parece ter influência direta no maior isolamento do patógeno, diferença não observada na quantificação de micro-organismos indicadores.

Na linha B, as condições não eram as mesmas, pois as esteiras lisas sem aspersão transportavam produtos que continham pele.

Na linha C, as esteiras lisas com aspersão apresentaram chance significativamente maior de isolar *L. monocytogenes* quando comparadas com as sem aspersão (OR=4,059; IC=1,556-10,588). Nas esteiras modulares, observou-se o inverso, a chance de isolamento foi significativamente maior nas esteiras sem aspersão (OR=6,378; IC=2,262-17,986).

Na comparação entre as esteiras, a chance de isolamento foi significativamente maior nas lisas com aspersão quando comparadas com as modulares com aspersão (OR=6,378; IC=2,262-17,986), ao contrário do que foi observado nas esteiras sem a higienização, onde as modulares apresentaram maior chance de isolamento do patógeno (OR=0,246; IC=0,094-0,643).

Nesta linha, as chances de isolamento de *L. monocytogenes* maiores ou menores, parecem estar relacionadas diretamente a fatores ligados ao fluxo de produtos transportados nas esteiras, uma vez que a lisa com aspersão apresentava fluxo maior de produtos e intensa manipulação por parte de funcionários, o que parece ter aumentado significativamente o isolamento de *L. monocytogenes* neste equipamento.

Na linha D, o patógeno foi isolado apenas nas esteiras modulares com água, sendo a chance de isolamento nesta esteira significativa quando comparada com as demais (OR=1,0; IC=<0,001).

Na Tabela 10 encontram-se os resultados de Razão de Chance (OR) e intervalo de confiança (IC) da pesquisa de *L. monocytogenes* em amostras de esteiras lisas e modulares com e sem aspersão de água avaliadas em diferentes tempos (T_0 , T_1 , T_2 e T_3).

Nas esteiras lisas e modulares com aspersão a chance de isolamento de *L. monocytogenes* em T_0 não apresentou diferença estatística em comparação aos tempos T_1 , T_2 e T_3 . Já nas esteiras sem aspersão, tanto nas lisas quanto nas modulares, a chance de isolamento de *L. monocytogenes* foi menor em T_0 do que nos demais tempos avaliados.

A frequência de isolamento do patógeno difere do estudo de Rodrigues et al. (2013), que avaliaram esteiras de salas de corte após o procedimento de desinfecção e não encontram *L. monocytogenes* nas superfícies desinfetadas.

A presença do patógeno em T_0 nesse estudo evidencia falha nos procedimentos de higienização pré-operacional e, portanto a persistência do micro-organismo nas esteiras.

Logo após o início do processamento, a passagem dos cortes pelas superfícies das esteiras levou à contaminação como pode ser observado no incremento do número de isolamentos de *L. monocytogenes*, sendo que este manteve constante ao longo do processo de industrialização em todas as esteiras avaliadas (Tabela 9).

Whyte et al. (2004) observaram que a recuperação de *Listeria* na pele de pescoço de aves no período noturno foi superior ao turno da manhã, sugerindo a ocorrência de maior contaminação cruzada na planta por parte dos equipamentos ao longo dos turnos de trabalho. No entanto, no presente estudo, apesar das frequências em T_3 terem sido numericamente maiores que T_1 e T_2 , os resultados não foram significativos.

Tabela 10. Frequências, Razão de Chance (OR) e intervalo de confiança (IC) da pesquisa de *L. monocytogenes* em amostras de esteiras lisas e modulares com e sem aspersão avaliadas em diferentes tempos (T₀, T₁, T₂ e T₃).

Esteira/Higienização	Frequências (%)	OR	IC 95%	
Lisa com aspersão	T ₀ (17,5) x T ₁ (20,0)	0,559	0,190	1,646
	T ₀ (17,5) x T ₂ (27,5)	0,848	0,273	2,636
	T ₀ (17,5) x T ₃ (25,0)	0,636	0,213	1,899
	T ₁ (20,0) x T ₂ (27,5)	1,517	0,532	4,328
	T ₁ (20,0) x T ₃ (25,0)	1,138	0,417	3,108
	T ₂ (27,5) x T ₃ (25,0)	0,750	0,259	2,171
Lisa sem aspersão	T ₀ (15,0) x T ₁ (35,0)	0,328	0,110	0,977
	T ₀ (15,0) x T ₂ (35,0)	0,328	0,110	0,977
	T ₀ (15,0) x T ₃ (40,0)	0,265	0,090	0,781
	T ₁ (35,0) x T ₂ (35,0)	1,000	0,396	2,524
	T ₁ (35,0) x T ₃ (40,0)	0,808	0,324	2,014
	T ₂ (35,0) x T ₃ (40,0)	0,808	0,324	2,014
Modular com aspersão	T ₀ (7,5) x T ₁ (10,0)	0,730	0,151	3,535
	T ₀ (7,5) x T ₂ (12,5)	0,568	0,125	2,584
	T ₀ (7,5) x T ₃ (17,5)	0,382	0,090	1,618
	T ₁ (10,0) x T ₂ (12,5)	0,778	0,191	3,172
	T ₁ (10,0) x T ₃ (17,5)	0,524	0,139	1,974
	T ₂ (12,5) x T ₃ (17,5)	0,673	0,193	2,355
Modular sem aspersão	T ₀ (2,5) x T ₁ (30,0)	0,060	0,007	0,495
	T ₀ (2,5) x T ₂ (27,5)	0,068	0,008	0,563
	T ₀ (2,5) x T ₃ (32,5)	0,053	0,006	0,439
	T ₁ (30,0) x T ₂ (27,5)	1,130	0,425	3,000
	T ₁ (30,0) x T ₃ (32,5)	0,890	0,343	2,310
	T ₂ (27,5) x T ₃ (32,5)	0,788	0,300	2,071

5.3.1 Caracterização molecular de *L. monocytogenes*

Na Tabela 11 estão apresentados os perfis de sorotipos das culturas de *L. monocytogenes* identificadas a partir de amostras superficiais das esteiras lisas e modulares.

Foram testadas 241 culturas (41 da linha A, 83 da B, 113 da C e 4 da D) com o predomínio do perfil 1/2a ou 3a, com uma frequência de 52,28% sendo que este perfil foi observado em todas as linhas avaliadas. O perfil 4b-v1 apresentou uma frequência de 47,30% sendo observado nas linhas B e C. Apenas uma (0,41%) cultura apresentou o perfil 1/2b, 3b ou 7 sendo encontrada na linha A.

São descritos na literatura mais de 14 sorotipos de *L. monocytogenes*, no entanto, somente três sorotipos (1/2a, 1/2b, e 4b) são os principais responsáveis pelos casos de listeriose em humanos.

O sorotipo 1/2a é mais frequentemente isolado de alimentos e o sorotipo 4b está relacionado com grande parte dos casos clínicos da doença (BORUCK & CALL, 2003; DOUMITH et al., 2004).

Deste modo, todos os sorotipos isolados nas quatro linhas de processamento estão relacionados com os sorotipos de maior potencial patogênico.

Tabela 11. Sorotipos identificados de culturas de *L. monocytogenes* obtidas a partir do isolamento em amostras superficiais de esteiras de quatro linhas de processamento (A, B, C e D).

Perfil	Total por linha				Total (n=241)
	A (n=41)	B (n=83)	C (n=113)	D (n=4)	
1/2a ou 3a	40	81	1	4	126 (52,28%)
4b-v1	-	2	112	-	114 (47,30%)
1/2b, 3b ou 7	1	-	-	-	1 (0,41%)

De acordo com a classificação de Doumith et al., (2004) as cepas podem ser divididas em quatro grupos, sendo: Grupo 1, composto dos sorotipos 1/2a e 3a (amplificação do fragmento de DNA *Imo0737*); Grupo 2, composto dos sorotipos 1/2c e 3c (amplificação de ambos fragmentos de DNA *Imo0737* e *Imo1118*); Grupo 3, composto pelos sorotipos 1/2b, 3b e 7 (amplificação do fragmento de DNA *ORF2819*); e Grupo 4, composto por cepas do sorotipo 4b, 4d e 4e (amplificação dos fragmentos de DNA *ORF2819* e *ORF2110*). O fragmento de DNA *prs* está presente em todos os grupos, pois caracteriza o gênero *Listeria*.

As cepas 4b-v1 isoladas neste estudo, apresentaram quatro fragmentos de DNA amplificados, que se referem aos genes *lmo0737*, *ORF2110*, *ORF2819* e *prs*, ou seja, este sorotipo apresenta fragmentos dos grupos 1 e 4, padrão não observado por DOUMITH et al. (2004).

No entanto, este perfil encontra-se descrito na literatura científica (HUANG et al., 2011; LECLERCQ et al, 2011) e este padrão molecular de sorotipo também foi observado por outros estudos em matadouros de aves no Brasil (CHIARINI et al, 2007; DIAS, 2008).

Os isolados que apresentaram este perfil foram submetidos a sorotipificação molecular segundo Borucki & Call (2003) e apresentaram o padrão molecular correspondente aos sorotipos 4b, 4d, 4a ou 4c.

5.3.2 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Para a PFGE foram testadas 132 cepas de *L. monocytogenes* isoladas das esteiras das quatro linhas de processamento, sendo 21 da linha A, 49 da B, 60 da C e duas da D.

Os isolados da linha A foram submetidos à macrorestrição com a enzima *Apal* e os demais isolados submetidos à macrorestrição com as enzimas *Apal* e *Ascl*.

Na Figura 2, estão representados os perfis e o nível de similaridade das cepas submetidas à macrorestrição pela enzima *Apal*.

Foram obtidos seis padrões diferentes de bandas nas amostras de *L. monocytogenes* avaliadas, sendo o perfil A observado em 42 cepas, destes, sete foram recuperadas da linha A e 35 da linha B, todas sorotipificadas como 1/2a ou 3a.

O perfil B esteve presente em 14 cepas, todas da linha A que foram sorotipificadas como 1/2a ou 3a. O perfil C foi encontrado em 12 cepas isoladas e o perfil D em apenas uma cepa, ambos da linha B e sorotipificadas como 1/2a ou 3a.

O perfil E foi observado em 60 cepas da linha C e uma da linha B, sendo estes sorotipificadas como 4b-v1 e, o perfil G foi observado em duas cepas da linha D e, ambas do sorotipo 1/2a ou 3a.

O grupo clonal I foi composto pelos perfis C e D, o grupo clonal II foi composto pelos perfis genéticos G, B e A, e o grupo clonal III composto pelo perfil E. O grupo clonal I apresentou 64,8% de similaridade em relação ao grupo II e, o grupo III apresentou 50,9% de similaridade em relação aos demais grupos.

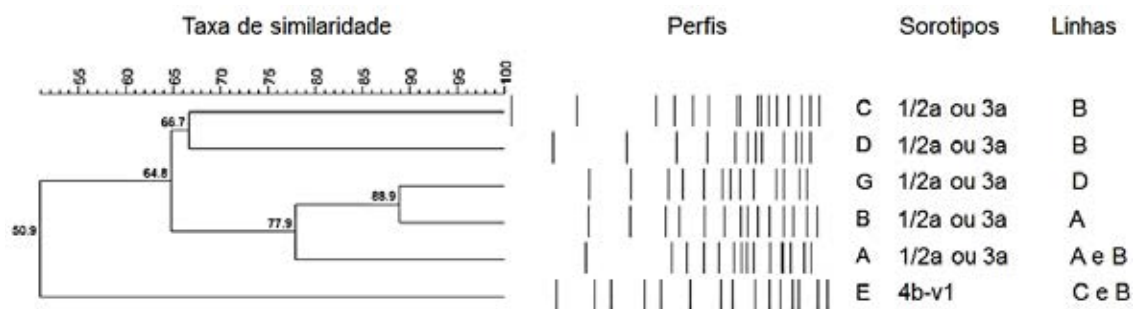


Figura 2. Perfis e taxa de similaridade das cepas submetidas à macrorestrição pela enzima *Apal*.

Na Figura 3 estão representados os perfis e nível de similaridade das cepas submetidas a macrorestrição pela enzima *Ascl*.

Foram obtidos nove padrões diferentes de bandas nas amostras de *L. monocytogenes* avaliadas, sendo o perfil A1 observado em 12 cepas da linha B, todas sorotipificadas como 1/2a ou 3a. O perfil B1 esteve presente em 30 cepas da linha B que foram sorotipificadas como 1/2a ou 3a.

O perfil C1 foi encontrado apenas em uma cepa, o perfil D1 em quatro cepas e o perfil E1 em uma cepa, todas da linha B e sorotipificadas como 1/2a ou 3a.

O perfil F1 foi observado em 58 cepas da linha C, todas pertencentes ao sorotipo 4b-v1. O perfil G1 esteve presente em duas cepas da linha C, sendo sorotipificadas como 4b-v1.

O perfil H1 foi observado em duas cepas da linha D, ambas eram do sorotipo 1/2a ou 3a. O perfil I1 foi encontrado em uma cepa da linha B, sorotipificada como 4b-v1.

No grupo clonal I estão os perfis genéticos B1, D1, E1, A1 e H1, no grupo II os perfis F1, I1 e G1 e no grupo clonal III apenas o perfil genético C1. A taxa de similaridade entre os grupos I e II foi de 47,5% e a similaridade entre o grupo III e os demais foi de 46,2%.

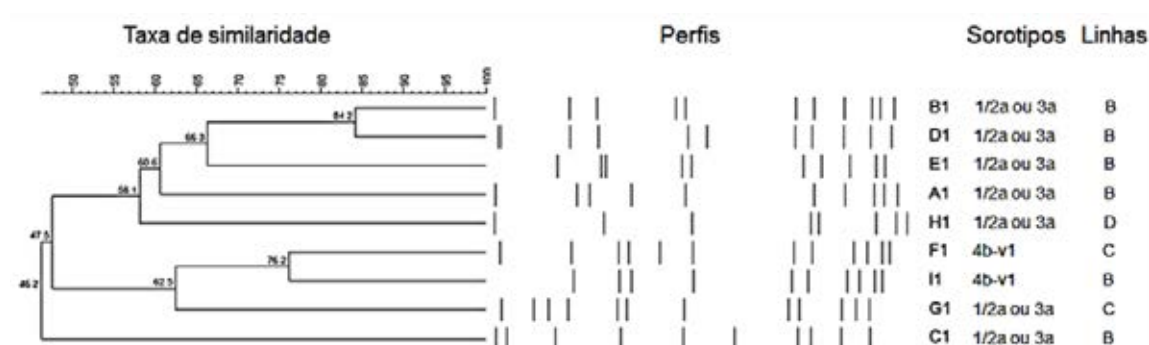


Figura 3. Perfis e taxa de similaridade das cepas submetidas à macrorestrição pela enzima *Ascl*.

Na Figura 4 estão discriminados os perfis da linha A e os perfis combinados das linhas B, C e D das culturas submetidas à macrorestrição com as enzimas *Apal* e *Ascl*, de acordo com esteira, momento e data de coleta das linhas de processamento.

Na linha A, o perfil A somente não foi isolado na esteira modular sem aspersão, tendo sido isolado apenas uma vez nas esteiras lisa e modular com aspersão. Na esteira lisa sem aspersão, o perfil A esteve presente nos tempos T_1 , T_2 e T_3 e, ao longo de um período de coleta de dois meses.

O perfil B foi recuperado em todas as esteiras avaliadas. Na esteira modular com aspersão, o perfil B foi recuperado uma única vez. Na esteira modular sem aspersão, observou-se o perfil B nos tempos T_1 e T_2 na primeira e segunda coleta, respectivamente.

O perfil B esteve presente na esteira lisa com água nos tempos T_2 e T_3 na quinta coleta e foi recuperado novamente na nona coleta, ou três semanas após seu primeiro isolamento. Na esteira lisa sem aspersão, o perfil B foi recuperado em oito momentos distintos ao longo de sete semanas nos tempos T_1 , T_2 e T_3 .

Na combinação dos perfis nas linhas B, C e D foram encontrados nove pulsotipos diferentes.

Na linha B foram observados seis perfis combinados distintos (A1C, B1A, C1D, D1A, E1A e I1E), todos sorotipificados como 1/2a ou 3a, exceto o perfil genético I1E que foi sorotipificado como 4b-v1.

Na esteira lisa com aspersão, de nove cepas testadas, sete eram do perfil B1A e duas do perfil A1C, sendo que o perfil B1A foi recuperado de todos os tempos avaliados (T_0 , T_1 , T_2 e T_3) e esteve presente mesmo dois meses

após sua primeira recuperação e, o perfil A1C foi isolado nos tempos T_1 e T_3 em dias subsequentes (coleta 19 e 20).

Na esteira lisa sem aspersão, 23 cepas foram avaliadas e quatro apresentaram o perfil A1C, 18 o perfil B1A e uma E1A isolada na coleta 17 no tempo T_0 . O perfil A1C foi observado nas três primeiras coletas e esteve presente em todos os tempos (T_0 , T_1 , T_2 e T_3), o perfil B1A somente não foi observado no tempo T_0 , no entanto, esteve presente em todas as coletas, onde foi possível sua recuperação, portanto foi observado após dois meses de sua primeira recuperação.

Na esteira modular com aspersão, os perfis A1C, D1A e I1E foram isolados apenas uma vez nos tempos T_3 , T_2 e T_0 , respectivamente. O perfil B1A observado em três cepas testadas esteve presente nos tempos T_0 e T_2 , sendo uma das cepas recuperada após dois meses de seu primeiro isolamento.

Na esteira modular sem aspersão de 11 culturas avaliadas, cinco eram do perfil A1C, duas do perfil B1A, três do perfil D1A e uma do perfil C1D que foi encontrado na primeira coleta do tempo T_3 da linha B. O perfil A1C foi isolado dos tempos T_1 , T_2 e T_3 , sendo observado dois meses após sua primeira coleta.

O perfil B1A, presente no tempo T_3 , foi recuperado novamente no tempo T_2 após dois meses. As três cepas do perfil D1A foram observadas nos tempos T_1 e T_3 em três coletas distintas e seguidas (Coleta 16, 17 e 18).

Na linha C, de 60 cepas pesquisadas 58 apresentaram o perfil genético F1E, sorotipo 4b-v1, que esteve presente em todas as esteiras, tempos (T_0 , T_1 , T_2 e T_3) e coletas, sendo de até 18 dias o intervalo entre o primeiro e o último isolamento destas cepas.

Em duas cepas foi observado o perfil combinado G1E (sorotipo 1/2a ou 3a), isoladas das esteiras lisas com aspersão e modular sem aspersão, ambas do tempo T_3 e recuperadas na última coleta desta linha.

Na linha D, duas cepas com o perfil H1G (sorotipo 1/2a ou 3a) foram isoladas na esteira modular com aspersão, com um intervalo de 15 dias entre as coletas.

	Lisa com água				Lisa sem água				Modular com água				Modular sem água				Dia de coleta
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	
Linha A	1					A									B		1
	2						B		A					B			12
	3					B	B	B									14
	4			A			A	B									21
	5		B	B		B		B									35
	6										B						42
	7																49
	8							A									56
	9	B					B										59
	10					A		A									63
Linha B	11					A1C	B1A					A1C			A1C	C1D	1
	12				A1C	B1A		B1A			B1A						2
	13						A1C	A1C								B1A	3
	14	B1A	B1A				B1A	B1A									4
	15			B1A			B1A	B1A	B1A						A1C	A1C	5
	16					B1A	B1A	B1A								D1A	72
	17	B1A	B1A		E1A	B1A	B1A				D1A				D1A		73
	18					B1A	B1A	B1A						D1A	B1A		74
	19			B1A	A1C		B1A	B1A	B1A	B1A				A1C	A1C		75
	20	B1A	A1C							I1E							76
	21	F1E	F1E	F1E		F1E	F1E							F1E	F1E	F1E	1
Linha C	22			F1E			F1E		F1E					F1E	F1E	F1E	2
	23	F1E			F1E			F1E							F1E	F1E	3
	24			F1E							F1E	F1E		F1E	F1E	F1E	4
	25	F1E			F1E									F1E	F1E	F1E	5
	26	F1E	F1E	F1E	F1E		F1E			F1E		F1E					15
	27		F1E	F1E	F1E						F1E			F1E		F1E	16
	28	F1E	F1E			F1E		F1E					F1E	F1E		F1E	17
	29		F1E									F1E		F1E		F1E	18
	30		F1E		G1E	F1E						F1E				G1E	19
	31											H1G					1
Linha D	32																2
	33																3
	34																4
	35																5
	36																15
	37									H1G							16
	38																17
	39																18
	40																19

Figura 4. Mapa dos perfis da linha de processamento A e dos perfis combinados das linhas B, C e D de culturas submetidas à macrorestrição com as enzimas *Apal* e *Ascl*, de acordo com esteira, momento e data de coleta.

A recuperação de cepas com mesmo perfil genético tanto ao longo dos dias como em semanas e meses diferentes de coleta, indica falha no processo de higienização operacional como demonstrada também nas frequências de *L.*

monocytogenes isolada em T_0 . Esta falha pode levar à persistência de grupos genéticos numa mesma planta de processamento e a colonização das superfícies, uma vez que *L. monocytogenes* é capaz de formar biofilmes em superfícies que entram ou não em contato com alimentos.

É importante ressaltar que a adesão de *L. monocytogenes* acontece firme e rapidamente nas superfícies inertes utilizadas na indústria de alimentos (FRANK & KOFFI, 1990), podendo ocorrer a partir de poucos minutos a algumas horas.

Devido à rapidez em que ocorre esta primeira fase, *L. monocytogenes* pode aderir-se em plantas de processamento de alimentos, máquinas e instalações industriais, resultando numa fonte contínua de contaminação para os produtos de origem animal; neste sentido, considera-se que a primeira fase da formação de biofilmes é crucial para a contaminação do processo (BRYERS & FLETCHER, 2000) e reside nesta etapa o principal ponto de controle da indústria, que está diretamente relacionado com a eficiência de higienização pré-operacional.

A primeira etapa da formação de biofilmes (adesão) de cepas que estão dispersas no ambiente de processamento e que estão nele há vários anos é muito mais forte do que para aquelas que acabaram de entrar no ambiente industrial, sendo que as mais antigas estão intimamente relacionadas com a contaminação por *L. monocytogenes* nos produtos (LUNDEN et al., 2000).

Em nosso caso, para afirmar que as cepas isoladas neste estudo são antigas e persistentes seriam necessárias novas avaliações destas superfícies, pois de acordo com Lundén et al. (2000) as cepas são consideradas persistentes quando são isoladas de equipamentos, ambientes e produtos de um matadouro repetidas vezes ao longo de meses ou anos.

6 CONCLUSÕES

O efeito da utilização da aspersão com água nas esteiras condutoras de cortes de frango foi dependente de diversos fatores, tais como a linha de processamento, tipo de produto, design do equipamento e o tipo de esteira. Assim sendo, a decisão de se retirar a água do processo deve ser precedida de um estudo criterioso para garantir que a sua ausência não venha influenciar na inocuidade dos produtos de origem animal.

Nas condições do presente estudo, baseando-se nas contagens de micro-organismos indicadores, as esteiras do tipo lisa foram as que apresentaram as melhores condições de higiene.

A higienização por aspersão não foi o fator primordial para garantir a eliminação de *L. monocytogenes*, uma vez que o patógeno foi isolado independente da linha de processamento e tipo de esteira, demonstrando que a higienização operacional é o procedimento chave para a redução das frequências deste micro-organismo.

Houve variação dos sorotipos de *L. monocytogenes* isolados dependendo da linha de processamento avaliada e, como esperado, os sorotipos 1/2a, 3a e 4b-v1 foram os que apresentaram as maiores frequências demonstrando a relação que estes tem com produtos de origem animal.

Os perfis genéticos dos isolados de *L. monocytogenes* evidenciaram a disseminação do patógeno dentro das linhas de processamento ao longo dos períodos de coletas, apontando falhas nos processos de higienização utilizadas nas linhas de processamento.

7 REFERÊNCIAS

1. AXELSSON, L.; HOLCK, A.; RUD, I.; SAMAH, D.; TIERCE, P.; FAVRE, M.; KURE, C.F. Cleaning of conveyor belt materials using ultrasound in a thin layer of water. **Journal of Food Protection**, v.76, p.1308-1479, 2013.
2. BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; SILVIA, L.C.; D'OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, p.593-596, 2007.
3. BERESFORD, M.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.1000-1005, 2001.
4. BERSOT, L.S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Production of mortadella: Behavior of *Listeria monocytogenes* under commercial manufacturing and storage conditions. **Meat Science**, v.57, p.13-17, 2001.
5. BERSOT, L.S.; GILLIO, C.; TAVOLARO, P.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.9, p.514-516, 2008.
6. BERSOT, L.S.; PEREIRA, J.G.; ZANETTE, C.M.; SOARES, V.M. ; NERO, L.A.; PINTO, J.P.A.N.; BARCELLOS, V.C. Superficial Contamination of Conveyor Belts in Chicken Cutting Area: Effect of Cleaning by Water Spray at 45°C. In: International Association for Food Protection Annual Meeting 2012, 2012, Rhode Island, USA. **Journal of Food Protection**, Supplement A, 2012.
7. BORUCKI M.K.; CALL D.R. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR, **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.5537-5540, 2003.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n.146, de 07 de março de 1996. Regulamento técnico geral para a fixação dos requisitos microbiológicos de queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1996.
9. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 210 de 10 de Novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1998.
10. BRASIL. Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2001.
11. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular 369 de 2 de junho de 2003. Instruções para elaboração e implantação dos sistemas

- PPHO e APPCC nos estabelecimentos habilitados à exportação de carnes. Brasília, DF. 2003.
12. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular n.175, de 16 de maio de 2005. Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. Brasília, DF. 2005.
 13. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.9, de 08 de abril de 2009. Procedimentos de controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2009.
 14. BRYERS, D.; FLETCHER, M. Biofilm formation and persistence. In **Biofilms II: Process Analysis and Applications**. ed. BRYERS, J.D. p45–88. New York: WILEY-LISS, 2000.
 15. CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; MORENO, B.; GARCÍA-FERNANDEZ, MC. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. **International Journal of Food Microbiology**, v.65, p.75–82, 2001.
 16. CARTWRIGHT, E.J.; JACKSON, K.A.; JOHNSON S.D.; GRAVES, L.M.; SILK B.J., MAHON, B.E. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, p.1-9, 2013.
 17. CHIARINI, E.; TYLER, K.; FARBER, J.M.; PAGOTTO, F.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: manual and automatic evisceration. **Poultry Science**, v.88, p.791-797, 2009.
 18. CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p.22-32, 2003.
 19. DALTON, C.B.; AUSTIN, C.C.; SOBEL, J.; HAYES, P.S.; BIBB, W.F.; GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M.E.; GRIFFIN, P.M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.336, p.100-105, 1997.
 20. DESTRO, M.T. *Listeria* and Listeriosis in South America: Where we are ? In: XVIII International symposium on problems of listeriosis – ISOPOL, **Anais do Evento**, Goa, Índia, 2013.
 21. DIAS, D.A.M. **Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de processamento industrial de frango em um matadouro localizado no Estado de São Paulo**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. 2008.

22. DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; McLANDSBOROUGH, L.A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2950–2958, 2002.
23. DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.8, p 3819–3822, 2004.
24. DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997.
25. EC - EUROPEAN COMMUNITY - COMMISSION REGULATION – Decision 471/2001. **Official Journal of the European Union**. L.165, p. 48-53, 8 Junho 2001.
26. EFSA - European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. **EFSA Journal**, v.11, p.1-75, 2013a.
27. EFSA - European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. **EFSA Journal**, v. 11, 250p, 2013b.
28. EUA – Estados Unidos da América. Centers for Disease Control and Prevention. 2009. **PulseNet protocols**. Disponível em <<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf> >. Acessado: 03 de julho de 2014.
29. EUA – Estados Unidos da América. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 1998–2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v.62, n.2, p.1-34. 2013a.
30. EUA – Estados Unidos da América. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2009–2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v.62, n.3, p.41-60. 2013b.
31. FARBER, J.M.; ROSS, W.H.; HARWIG, J. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v.30 p.145-56, 1996.
32. FENLON, D.R. ***Listeria monocytogenes* in the natural environment**. In.: *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (eds). New York, NY, USA: Marcel Dekker, p 21–38, 1999.
33. FOERSTER, C.; VIDAL, L.; TRONCOSO, M.; FIGUEROA, G. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cattle and ground beef by pulsed-field

- gel electrophoresis. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.44, p.195-200, 2012.
34. FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. São Paulo: ARTMED, 2005.
 35. FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: ATHENEU, 2008.
 36. FRANK, J.F., KOFFI, R.A. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**, v.53, p.550-554, 1990
 37. GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.1-15, 2007.
 38. GELLIN, B.G.; BROOME C.V. Listeriosis. **JAMA**, v.261, p.1313–1320, 1989.
 39. GILOT, P.; GENICOT, A.; ANDRE, P. Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.1007-1010, 1996.
 40. GÓMEZ, D.; AZÓN, E.; MARCO, N.; CARRAMIÑANA, J.J.; ROTA, C.; ARIÑO, A.; YANGÜELA, J. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. **Food Microbiology**, v.42, p.61-65, 2014.
 41. GOULET, V.; MARCHETTI, P. Listeriosis in 225 non-pregnant patients in 1992: clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v.28, p.367–374, 1996.
 42. GRAVES, L.M., SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**. v.65, p.55–62, 2001.
 43. GRAVES, L.M.; HELSEL, L.O.; STEIGERWALT, A.G.; MOREY, R.E.; DANESHVAR, M. I.; ROOF, S.E.; ORSI, R.H.; FORTES, E.D.; MILILLO, S.R.; DEN BAKKER, H.C.; WIEDMANN, M.; SWAMINATHAN, B.; SAUDERS, B.D. *Listeria marthii* sp. isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal Systematic and Evolucionary Microbiology**, v.60, p.1280–1288, 2010.
 44. GUDBJÖRNSDÓTTIR, B; SUIHKO, M.L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S. SJÖBERG, A.M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, v.21, p.217-225, 2004.

45. HARVEY, J.; KEENANA, K.P.; GILMOURA, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, v.24, p.380– 392, 2007.
46. HC - HEALTH CANADA. MFLP-41 - Environmental sampling for the detection of microorganisms. In: **Compendium of Analytical Methods**, vol 3, 2010.
47. HOFER, C.B.; MELLES, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 41, p.375-377, 1999.
48. HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; Oliveira, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p.173-177, 1998.
49. HUANG, B.; FANG, N.; DIMOVSKI, K.; WANG, X.; HOGG, G.; BATES, J. Observation of a new pattern in serogroup-related PCR typing of *Listeria monocytogenes* 4b isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.426-429, 2011.
50. ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies. **Micro-Organisms in Foods: Microbiological Specifications of Food Pathogens**, London, UK: Blackie Academic & Professional. 1996.
51. ILSI RESEARCH FOUNDATION/RISK SCIENCE INSTITUTE, EXPERT PANEL ON LISTERIA MONOCYTOGENES IN FOODS. Achieving Continuous Improvement in Reductions in Foodborne Listeriosis - A Risk-Based Approach. **Journal of Food Protection**, v. 68, 2005, p.1932–1994, 2005.
52. JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
53. JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern food microbiology**. 7.ed. New York: SPRINGER, 2005.
54. JENSEN, A.; FREDERIKSEN W.; GERNER-SMIDT, P. Risk for listeriosis in Denmark, 1989–1990. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v.26, p.171-178, 1994.
55. LECLERCQ, A.; CHENAL-FRANCISQUE, V.; DIEYE, H.; CANTINELLI, T.; DRALI, R.; BRISSE, S.; LECUIT, M. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. **International Journal of Food Microbiology**, v.147, p.74-77, 2011.
56. LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P.A.; LE FLECHE-MATEOS, A.; ROCHE, S.M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, 2009.
57. LECUIT, M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p.430-436, 2005.

58. LUNDEN, J.M.; MIETTINEN, M.K.; AUTIO, T.J.; KORKEALA, H.J. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. **Journal of Food Protection**, v.63, p.1204-1207, 2000.
59. MARKKULA, AUTIO, T.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel eletrophoresis. **Journal of Food Protection**, v.68, p.1228-1231, 2005.
60. MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infection Disease**, Atlanta, v.5, p.607–625, 1999.
61. MELONI, D.; PIRAS, F.; MUREDDU, A.; FOIS, F.; CONSOLATI, S.G.; LAMON, S.; MAZZETTE, R. *Listeria monocytogenes* in Five Sardinian Swine Slaughterhouses: Prevalence, Serotype, and Genotype Characterization. **Journal of Food Protection**, v.76, p.1863-1867, 2013.
62. MOREY, A.; MCKEE, S.R.; DICKSON, J.S.; SINGH, M. Efficacy of Ultraviolet Light Exposure Against Survival of *Listeria monocytogenes* on Conveyor Belts. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, p.737-740, 2010.
63. NALÉRIO, E.S.; ARAÚJO, M.R.; MENDONÇA, K.S.; BASSANI, M.T.; SILVA, W.P. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.3, p.626-630, 2009.
64. OCHIAI, Y.; YAMADA, F.; BATMUNKH, O.; MOCHIZUKI, M.; TAKANO, T.; HONDO, R.; UEDA, F. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retailed meat in the Tokyo metropolitan area. **Journal of Food Protection**, v.79, p.1688-1693, 2010.
65. OJENIYI, B.; WEGENER, H.C.; JENSEN, N.E.; BISGAARD, M. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. **Journal of Applied Bacteriology**, v.80, p.395-401, 1996.
66. PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all foods and environmental samples (MFHPB-30). **Compendium of Analytical Methods**, v. 2, 2001.
67. RAGON, M.; WIRTH, T.; HOLLANDT, F.; LAVENIR, R.; LECUIT, M.; LE MONNIER, A.; BRISSE, S. A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. **PLoS Pathogens**. v.4, p.1-14. 2008.
68. ROCOURT, J.; ESPAZE, E.P.; MINCK, R., CATIMEL, B., HUBERT, B.; COURTIEU, A.L. Cluster of listeriosis isolates with different serovar and phagovar characteristics. **The Lancet**, v.2, p.1217-1218, 1989.

69. RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; RIZZO, N.N.; TAGLIARI, V.Z.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A.P.; FERREIRA, D.; PILOTTO, F.; NASCIMENTO, V.P. *Salmonella* and *Listeria* from stainless steel, polyurethane and polyethylene surfaces in the cutting room of a poultry slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, p.1-7, 2013.
70. RYSER, E.T.; MARTH, E.H. ***Listeria*, listeriosis and food safety**. 3.ed, Boca Raton: Taylor and Francis, 2006.
71. SAKARIDIS, I.; SOULTOS, N.; IOSSIFIDOU, E.; PAPA, A.; AMBROSIADIS, I.; KOIDIS, P. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated in Chicken Slaughterhouses in Northern Greece. **Journal of Food Protection**, v.74, p.1017-1021, 2011.
72. SANT'ANA, A.S.; BARBOSA, M.S.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p.52-58, 2012.
73. SLADE, P.J. Monitoring *Listeria* in the food production environment. I. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. **Food Research International**, v.25, p. 45-56, 1992.
74. SLEATOR, R. D.; GAHAN, C. G.; HILL, C. Apostgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1-9, 2003.
75. SOARES, V.M.; PEREIRA, J.G.; ZANETTE, C.M.; NERO, L.A.; PINTO, J.P.A.N.; BARCELLOS, V.C.; BERSOT, L.S. Cleaning conveyor belts in the chicken-cutting area of a poultry processing plant with 45°C water. **Journal of Food Protection**, v.77, p.496-498, 2014.
76. SOUZA-JÚNIOR, L.C.; PEREIRA, J.G.; SPINA, T.L.; IZIDORO, T.B.; OLIVEIRA, A.C.; PINTO, J.P.A.N. Microbiological evaluation of chicken carcasses in an immersion chilling system with water renewal at 8 and 16 hours. **Journal of Food Protection**, v.75, p.973-975, 2012.
77. SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**. n.9, p.1236–1243, 2007.
78. THÉVENOT, D.; DELIGNETTE-MULLER, M.L.; CHRISTIEANS, S.; VERNZOY-ROZAND, C. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. **International Journal of Food Microbiology**. v.102, p.85-94, 2005.
79. TOLVANÉN, R.; LUNDEN, J.; KORKEALA, H.; WIRTANEN, G. Ultrasonic cleaning of conveyor belt materials using *Listeria monocytogenes* as a model organism. **Journal of Food Protection**, v.70, p.758-761, 2007.

80. VELUZ, G.A., PITCHIAH, S., ALVARADO, C.Z. Attachment of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes* to stainless steel and plastic conveyor belts. **Poultry Science**, v.91,p.2004-2010, 2012.
81. VITAS, A.I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, V.A. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.349-356, 2004.
82. WHYTE, P.; MCGILL, K.; MONAHAN, C.; COLLINS, J.D. The effect of sampling time on the levels of micro-organisms recovered from broiler carcasses in a commercial slaughter plant. **Food Microbiology**, v.21, p.59-65, 2004.
83. WIECZOREK, K.; DMOWSKA, K., OSEK, J. Prevalence, Characterization, and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates from Bovine Hides and Carcasses. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.2043-2045, 2012.
84. ZHU, L.; FENG, X.; ZHANG, L.; ZHU, R.; LUO, X. Prevalence and serotypes of *Listeria monocytogenes* contamination in Chinese beef processing plants. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, p.556-560, 2012.

8 TRABALHO CIENTÍFICO

Título do artigo: Cleaning conveyor belts in the chicken-cutting area of a poultry processing plant with 45°C water

Trabalho a ser enviado para o *Journal of Food Protection*

Normas gerais para publicação na revista

Os trabalhos enviados ao *Journal of Food Protection* devem ser digitados em espaço duplo, com fonte tamanho 10 incluindo referências, tabelas, legendas de tabelas, notas de rodapé e legendas. Os trabalhos devem ser feitos em Word, WordPerfect ou editores de texto. As margens da página de todos os lados devem ser de pelo menos 2,5 cm de largura. As linhas das páginas devem ser numeradas para facilitar a análise dos documentos, mas a versão final dos manuscritos não deve ter números de linha. Os trabalhos devem ser divididos em seções, que devem ser dispostos na seguinte ordem: Título, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, referências, legendas de figuras, tabelas, e Figuras.

RESEARCH NOTE

Title: Cleaning conveyor belts in the chicken-cutting area of a poultry processing plant with 45°C water

Running title: Effect of cleaning the contamination of conveyor belts

Authors: Soares, V.M.¹, Pereira, J.G.*², Zanette, C.M.³, Nero, L.A.⁴, Pinto, J.P.A.N.¹, Barcellos, V.C.³, Bersot, L.S.³

¹Sao Paulo State University, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus - Sao Paulo, Brazil. PO Box 572. Tel: +55 14 38116273

²Federal University of Pampa, Uruguaiiana Campus, Rodovia BR 472, Km 592, CEP 97.500970, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel: +55 55 34134321

³Federal University of Paraná. Palotina Campus, Palotina, Paraná, Brazil. Tel: +55 44 32118516

⁴Federal University of Viçosa, CEP 36.570-000, Viçosa, MG, Brazil. Tel.: + 55 31 38991463.

Keywords: chicken, conveyor belts, indicator microorganisms, operational cleaning procedure

*Author for correspondence: Phone: +55 55 34134321; Fax: +55 44 32118513

E-mail: julianopereira@veterinaria.com.br

ABSTRACT

Conveyor belts are widely used in food-handling areas, especially in poultry processing plants. Because they are in direct contact with food and it is a requirement of the Brazilian health authority, conveyor belts are required to be continuously cleaned with hot water under pressure. The use of water in this procedure has been questioned based on the hypothesis that water may further disseminate microorganisms but not effectively reduce the organic material on the surface. Moreover, reducing the use of water in processing may contribute to a reduction in costs and emission of effluents, but no consistent evidence to remove water during conveyor belt cleaning has been reported. Therefore, the objective of the present study was to compare bacterial counts on conveyor belts that were or were not continuously cleaned with hot water under pressure. Superficial samples of conveyor belts (cleaned or not) were collected at three different times during operation (T1: after the preoperational cleaning - 5 am, T2: after the first work shift - 4 pm, and T3: after the second work shift - 1:30 am) in a processing facility of poultry meat, and the samples were subjected to mesophilic and enterobacteria counts. For *Enterobacteriaceae*, no significant differences were observed between the conveyor belts, independent of the time of sampling or the cleaning process. No significant differences were observed between the counts of mesophilic bacteria at the distinct times of sampling on the conveyor belt that had not been subjected to continuous cleaning with water at 45°C. When comparing similar periods of sampling, no significant differences were observed between the mesophilic counts that were obtained from the conveyor belts that were or were not subjected to continuous cleaning with water at 45°C. Continuous cleaning with water did not significantly reduce microorganism counts, suggesting the possibility of discarding this procedure in chicken processing.

Brazil is the largest exporter of poultry meat in the world (4). This position in the poultry market is due in large part to the modernization of the sector and the technification of slaughter and processing to meet the demands of the domestic and foreign markets and to support the growing demand for a significant increase in the production of food animals, especially of poultry origin. The slaughter and production of poultry cuts in Brazil occurs in large volume. In 2012, approximately 5.24 billion birds were slaughtered in the Brazilian industry of chicken meat.

To achieve this number of processed birds in a practical manner, poultry meat cuts are nearly exclusively obtained using continuous conveyor belts. Because these conveyor belts are in direct contact with poultry carcasses and cuts, the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply requires that such equipment should be continuously cleaned by automatic spraying with water (8, 9).

This cleaning system using water aims at preventing contamination from the food that comes in contact with the belt from being transferred to other products that are processed on the same belt. When inadequately cleaned, conveyor belts and other equipment that is used during the slaughter and processing of meats may serve as sources of microorganisms (7, 11, 12, 16).

However, it may be considered that, although water physically removes dirt, it may spread organic material and enable the dissemination of microorganisms that gradually and continuously contaminate other products on these surfaces and the processing environment through aerosolization. Based on this hypothesis, the possibility of removing the water from this operational process was evaluated. Additionally, not using water may contribute significantly to reduced costs in the industry and decreased emission of effluents with high levels of organic material into the environment.

No consistent evidence exists to suggest completely removing the use of water from conveyor belt cleaning; however, once residues adhere to equipment and surfaces, they may become potential sources of contamination due to biofilm production on the surface of this equipment (1, 18). The solid-liquid interface between the surface and the aqueous medium provides an ideal environment for bacterial attachment and multiplication (2, 5, 15). Bacteria are attracted to these interfaces, and biofilms begin to be formed on solid surfaces that come in contact with the liquid. The humidity and temperature of the environment may contribute to bacterial multiplication and, consequently, to biofilm formation. Biofilms are formed by different species of bacteria pathogenic to men, such as *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* (6, 14, 15, 17). These biofilms may serve as permanent sources of contamination of foods, thus risking the innocuousness and quality of the food that is produced in these conditions.

Based on these considerations, the objective of the present study was to compare microbial counts on conveyor belts that were or were not subjected to continuous cleaning by water spraying at 45°C in the chicken cutting area of a poultry abattoir.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted at a poultry slaughterhouse in Paraná, Brazil, licensed as a poultry meat exporter, and mean slaughtering capacity was 320,000 birds/day. The facility had a cutting area of 831 m², kept at controlled temperature, between 10 and 12°C.

Two conveyor belts were selected that were fabricated with polyurethane, were 0.45-m wide and 10-m long and received the same type of cut (legs and drumsticks) during the experiment. The system of cleaning the conveyor belt consisted of continuous spraying of heated (45°C) and chlorinated (1 ppm) water at a given point of the belt to sanitize the surface during its movement, and this spray system (1 atm) was in operation throughout the entire day. The cleaning system of one of the conveyor belts remained off during the experiment.

Superficial samples were collected twice a week over six weeks. In each sampling, triplicates (three different points) were collected at three times (T1, T2 and T3) from both conveyor belts (with or without continuous cleaning). The following times were used for sampling: T1 - after the preoperational cleaning (5 am); T2 – after the first work shift (4 pm); T3 - after the second work shift (1:30 am), which completed the two work shifts of conveyor belt use.

Collection of conveyor belt samples. Superficial samples were collected using moistened sterile swabs of 100 cm²-delimited area (10 x 10 cm²) that were transferred to 10 mL of NaCl 0.85% (w/v) saline solution and refrigerated (4°C) during transport to the laboratory. A total of 216 samples were collected, 108 from each conveyor belt.

Microbiological analyses: aerobic mesophilic bacteria counts. The tubes containing the swabs were homogenized in a vortex for no less than 1 minute. Serial dilutions of the sample were prepared with 0.1% sterile saline peptone solution, and 1 mL of each dilution was dispensed onto the center of a Petri dish containing plate count agar (pour-plate method). Plates were incubated at 35-37°C/48 h. After the counting of colonies, the results were expressed in log CFU/cm² (10).

Microbiological analyses: *Enterobacteriaceae* counts. Serial dilutions were made as described, and 1 mL of each dilution was dispensed onto the center of a Petri dish containing violet red bile glucose (pour-plate method with overlay). The plates were incubated at 35-37°C/24 h. After counting of colonies, the results were expressed in log CFU/cm² (10).

Statistical procedure. The mean counts from each conveyor belt and times were compared by Analysis of Variance to verify significant differences ($p < 0.05$) using the Statistica 7.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the microbiological analyses of the conveyor belts are presented in Table 1. It was possible to verify the lower mean values of the mesophilic aerobes at the beginning of the processing (T1), when compared to the intermediate and final periods (T2 and T3) regardless of the cleaning method, but this difference was significant only for conveyor belts that were subjected to cleaning ($p < 0.05$).

The results were expected because preoperational cleaning aims to eliminate organic matter adhering to the surfaces of the conveyor belts and reduce bacterial counts through the use of sanitizers. Throughout the production process, contact with chicken meat contaminates the surfaces of conveyors, and the operational process of cleaning is not able to significantly reduce bacterial counts.

When comparing similar periods of sampling, no significant differences ($p > 0.05$) were observed between the mesophilic aerobe counts that were obtained from the conveyor belt that was subjected or not subjected to continuous cleaning with water at 45°C, which clearly indicated that the use of the hygienic conditions of the present study was not advantageous.

For *Enterobacteriaceae*, no significant differences ($p > 0.05$) were observed between the conveyor belts, independent of the time of sampling or cleaning process. Enterobacteria are good indicators of hygienic conditions because high counts indicate contamination during the process and inadequate cleaning and sanitizing. Furthermore, these conditions are favorable for the multiplication of different microorganisms, mainly enteropathogens, or possible biofilm formation (13).

Currently, no microbiological standards for determining the presence of microorganisms on the surface of equipment exist in Brazil. Thus, European standards (3) were used in the present study. Decision no. 471 of 2001 determines the acceptable limits for the counts of mesophilic aerobic microorganisms and enterobacteria on

the surface of equipment after preoperational (T1) cleaning procedures. This standard determines that counts of mesophilic aerobic microorganisms over 10 CFU/cm² (1 log) and of enterobacteria over 1 CFU/cm² (0 log) are “unacceptable” for food-contact surfaces, such as conveyor belts, after preoperational cleaning procedures. This regulation was used because it represents the requirements that are determined by the European Community for meat-exporting industries. The mean counts of mesophilic and *Enterobacteriaceae* that were obtained at T1 for the conveyor belts that were subjected or not subjected to the continuous cleaning system were in accordance with these reference values.

Considering the conditions that were evaluated in this study and the obtained results, no significant differences in the microbiological counts from conveyor belts that were cleaned or not cleaned were found. Additionally, continuous cleaning with water at 45°C did not significantly reduce mesophilic aerobes and *Enterobacteriaceae* counts on this equipment, suggesting the possibility of discarding this procedure in chicken processing to reduce the emission of effluents into the environment.

However, additional studies must be conducted to verify if this absence of differences can also be observed in the chicken products and to consider other microorganisms that are typically associated with poultry production. Based on this evidence, alternative cleaning processes must be proposed and evaluated to provide proper microbial load reduction on poultry processing facilities equipment.

REFERENCES

1. Chia, T. W. R., R. M. Goulter, T. McMeekin, G. A. Dykes, and N. Fegan. 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiol.* 26:853-859.
2. Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-745.
3. European Commission. 2001. Commission decision of 8 June 2001 laying down rules for the regular checks in the general hygiene carried out by the operators in establishments according to Directive 64/433/EEC on health conditions for the production and marketing of fresh meat and Directive 71/118/ECC on health problems affecting the production and placing on the market of fresh poultry meat, p. 48-53. Commission of the European Communities 2001/471/EC.

4. Food and Agriculture Organization. 2011. Food outlook. Food and Agriculture Organization, Rome.
5. Hood, S., and E. A. Zottola. 1995. Biofilms in food processing. *Food Control*. 6:8-18.
6. Joseph, B., S. K. Otta, and I. Karunasagar. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 367-371.
7. Keeratipibul, S., T. Oupaichit, and P. Techaruwichit. 2009. Contamination profiles of *Escherichia coli* and enterococci in steamed chicken meat products. *J. Food Prot.* 72:1821-1829.
8. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves (Portaria n.210, 10 de novembro de 1998). Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, Brasil.
9. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003. Instruções para elaboração e implantação dos sistemas PPHO e APPCC nos estabelecimentos habilitados à exportação de carnes (Circular n.369, 2 de junho de 2003). Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, Brasil.
10. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (Instrução Normativa n.62, 26 de agosto de 2003). Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, Brasil.
11. Morey, A., S. R. McKee, J. S. Dickson, and M. Singh. 2010. Efficacy of ultraviolet light exposure against survival of *Listeria monocytogenes* on conveyor belts. *Foodborne Pathog. Dis.* 7:737-7409.
12. Sheldon, B.W., and X. Li. 2004. Reducing the risk of microbial cross contamination using conveyor belts containing a microbial inhibitor. Abstract T16, International Association Food Protection Annual Meeting, Phoenix, Arizona, p. 138.

- 210 13. Shi, X., and X. Zhu. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci.Tech.*
211 2:407-413.
212
- 213 14. Silva, S., P. Teixeira, R. Oliveira, and J. Azeredo. 2008. Adhesion to and viability of *Listeria*
214 *monocytogenes* on food contact surfaces. *J. Food Prot.* 71:1379-1385.
215
- 216 15. Somers, E. B., J. L. Schoeni, and A. C. Wong. 1994. Effect of trisodium phosphate on biofilm and
217 planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria*
218 *monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* 22:269-276.
219
- 220 16. Thévenot, D., M. L. Delignette-Muller, S. Christieans, and C. Vernozy-Rozand. 2005. Prevalence of
221 *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products *Int. J. Food Microbiol.*
222 102:85-94.
223
- 224 17. Trachoo, N., J. F. Frank, and N. J. Stern. 2002. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from
225 chicken houses. *J. Food Prot.* 65, 1110-1116.
226
- 227 18. Veluz, G. A., S. Pitchiah, and C. Z. Alvarado. 2012. Attachment of *Salmonella* serovars and *Listeria*
228 *monocytogenes* to stainless steel and plastic conveyor belts. *Poult. Sci.* 91:2004-2010.

229 Table 1. Mean and standard deviation values of mesophilic aerobes and *Enterobacteriaceae* counts (log
 230 CFU/cm²) of superficial samples from conveyor belts.

Time*	Mesophilic aerobes		<i>Enterobacteriaceae</i>	
	Cleaning	No Cleaning	Cleaning	No Cleaning
T1 – After preoperational cleaning	0.37 ± 0.75 ^a	0.52 ± 0.56 ^{a,b}	-0.36 ± 0.58 ^a	-0.36 ± 0.39 ^a
T2 – After first shift	1.26 ± 0.71 ^c	0.96 ± 0.47 ^{b,c}	-0.04 ± 0.65 ^a	-0.16 ± 0.50 ^a
T3 – After second shift	1.05 ± 0.20 ^c	0.89 ± 0.67 ^{b,c}	-0.14 ± 0.57 ^a	-0.39 ± 0.66 ^a
ANOVA test	F _(5, 66) = 3.78; p < 0.05		F _(5, 56) = 0.57; p = 0.72	

231 *T1 - 5 am; T2 - 4 pm; T3 - 1:30 am.

232 ** mean values with distinct superscript letters indicate significant differences (p < 0.05) by the Fisher (LSD)
 233 test.