

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS E *Clostridium*
spp. E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Clostridium*
perfringens, *Escherichia coli* E *Salmonella* spp. EM
PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE DE FRANGO**

Mariana Froner Casagrande

Zootecnista

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS E *Clostridium*
spp. E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Clostridium*
perfringens, *Escherichia coli* E *Salmonella* spp. EM
PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE DE FRANGO**

Mariana Froner Casagrande

Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

Casagrande, Mariana Froner

C334q Quantificação de enterobactérias e *Clostridium* spp. e detecção molecular de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em pontos de cadeia produtiva da carne de frango / Mariana Froner Casagrande. - Jaboticabal, 2016
xiii, 75p. : il. ; 28 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Banca examinadora: Alessandra Aparecida Medeiros, Caroline Peters Pigatto De Nardi, Luiz Augusto do Amaral, Janete Aparecida Desiderio.

Bibliografia

1. Avicultura. 2. Bactérias Patogênicas. 3. Diversidade Genética. 4. Resistência a Antimicrobianos. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, *Campus* de Jaboticabal.

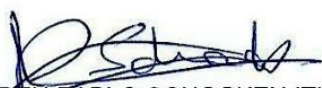
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS *Clostridium* spp. E
DETECÇÃO MOLECULAR DE *Clostridium perfringens*, *Escherichia*
coli E *Salmonella* spp. EM PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA DE
CARNE DE FRANGO

AUTORA: MARIANA FRONER CASAGRANDE

ORIENTADOR: RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO

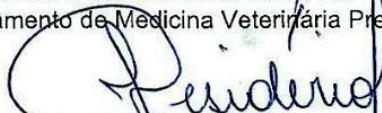
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em
MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



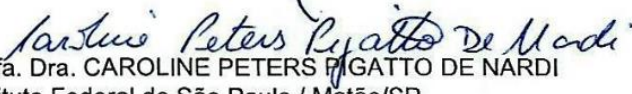
Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



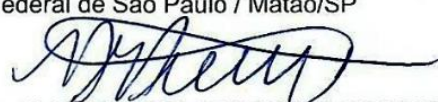
Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. JANETE APARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. CAROLINE PETERS RIGATTO DE NARDI
Instituto Federal de São Paulo / Matão/SP



Profa. Dra. ALESSANDRA APARECIDA MEDEIROS
Faculdade de Medicina Veterinária / UFU - Uberlândia/MG

Jaboticabal, 04 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIANA FRÖNER CASAGRANDE - nascida em Tanabi, SP, em 28 de setembro de 1984, em Tanabi, SP, e filha de Rita de Cássia Fröner Casagrande e Nilton Pedro Casagrande. Graduada em Zootecnia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, em janeiro de 2010. Durante a graduação, estagiou em diversas áreas como Manejo de Animais Silvestres e Nutrição de Ruminantes. Também estagiou no Laboratório de Nutrição de cães e Gatos de 2008 a 2009, onde realizou seu trabalho de conclusão de curso sob a orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi e co-orientação do Prof. Dr. Ricardo de Souza Vasconcelos, que foi intitulado “Influência do consumo de bebida industrializada sobre a ingestão hídrica e parâmetros urinários de gatos”. O Estágio de Conclusão de Curso foi realizado no período de agosto a novembro de 2009 no Polo Regional Centro Norte – UPD de Mirassol, na área de Manejo de Bovino de Corte. Em março 2010, ingresso no curso de Mestrado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP, com auxílio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A dissertação de mestrado intitulada “*Clostridium perfringens* em ingredientes para ração de aves e controle da presença do agente utilizando tratamento químico”, foi defendida em 29 de fevereiro de 2012. Em março de 2012, começou o curso de Doutorado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP, como bolsista CAPES e, posteriormente, como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Os ventos que às vezes tiram algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar...”

Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado.

Pois tudo aquilo que é realmente nosso, nunca se vai para sempre...”

Bob Marley

“O mundo é um lugar perigoso de se viver, não por causa daqueles que fazem o mal, mas sim por causa daqueles que observam e deixam o mal acontecer.”

Albert Einstein

“Aprenda a viver dentro de suas possibilidades. Buscar uma vida de aparências fora da sua realidade, só leva para um abismo sem volta. Construa a sua vida aos poucos, lutando a cada dia e extraíndo da vida o que ela tem de melhor: a SIMPLICIDADE”

Chico Xavier

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”.

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.”

Augusto Cury

Ofereço

Aos meus pais, Rita e Nilton, pela educação, amor, compreensão e por me incentivarem e apoiarem em todos os momentos de minha vida.

Ao meu irmão, João Vitor, pela ajuda, amizade, companheirismos e paciência.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Dedico

Aos meus avós maternos, Godofredo e Meire, e aos paternos, Modesto e Lídia (in memoriam), pelo exemplo de vida e pela confiança que dispensam a mim sempre.

“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo. Mas qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS, por estar sempre junto a mim, me dando forças e discernimento para enfrentar os obstáculos que aparecem em meu caminho.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal por oferecer os melhores professores e funcionários, que deram suporte para que fosse possível adquirir os conhecimentos necessários para meu crescimento profissional desde a graduação, em Zootecnia, até os dias atuais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro nos primeiros meses do curso de Doutorado.

À Coordenação de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro durante o curso de Doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino, por todo aprendizado profissional e pelas oportunidades oferecidas.

À técnica do Laboratório de Epidemiologia Molecular, Andressa de Souza Pollo, pelo ensino, paciência, amizade e, principalmente, pela sinceridade que ajudou muito em meu crescimento pessoal e profissional.

Aos membros banca examinadora, Dra. Alessandra Aparecida Medeiros, Dra. Caroline Peters Pigatto De Nardi, Dr. Luiz Augusto do Amaral, Dra. Janete Aparecida Desiderio, pela atenção dispensada e sugestões valiosas para a tornar minha tese mais rica.

Às pessoas do Laboratório de Microbiologia, Livia Boarini, Marita Vedovelli, Mariana Beraldo-Massoli e a Silvina Berchielli, pela amizade conquistada e pela ajuda dispensada na realização deste trabalho.

Aos amigos de Faculdade, Daniela (Jatinha), Panki, Lary, Roberta, Anne Caroline, Ingrid, Carol (Vem-ki-tem), pela amizade conquistada nesses anos me ajudando a enfrentar os problemas e compartilhar os momentos inesquecíveis de minha vida e pelo ensinamento que cada uma me proporcionou com formas diferentes e que me ajudou a amadurecer. Vocês estão guardadas no meu coração e espero estar sempre com vocês.

Às minhas amigas, Tatiane Leva, Michela, Inni, Tatiane Bula, Jonas, Patrícia, Enéias e Fabiane, que perto ou longe, estão sempre presentes nos bons e maus momentos de minha vida.

Aos estagiários, Renan e Mariana (Boo), pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio e pelo reconhecimento de minhas conquistas.

Aos meus “filhos peludos”, Nicolau, Fredie, Ponto, Kate, Yuri, Cherrie, Sadam, Hitler, pela companhia, amor e carinho.

Obrigada aos professores e funcionários do Laboratório de Microbiologia, que auxiliaram de alguma maneira na obtenção do meu título de Doutorado e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva que permitiram que eu utilizasse a estrutura para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida, pois, diretamente ou indiretamente, me ajudaram a crescer e a me tornar a pessoa que sou hoje.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1.	Avicultura.....	3
2.2.	Cadeia produtiva de aves de corte.....	4
2.3.	Processamento da carne de frango.....	5
2.4.	Padrões microbiológicos exigidos para comercialização de carne de frango e derivados.....	8
2.5.	Principais bactérias patogênicas encontradas na carne de frango.....	9
2.5.1.	<i>Clostridium</i> spp.	9
2.5.1.1.	<i>Clostridium perfringens</i>	10
2.5.2.	Enterobactérias.....	10
2.5.2.1.	<i>Salmonella</i> spp.	11
2.5.2.2.	<i>Escherichia coli</i>	12
2.5.2.2.1.	Classificação em patótipos de <i>E. coli</i>	12
2.5.2.2.1.1.	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica.....	13
2.5.2.2.1.2.	<i>Escherichia coli</i> shigatoxigênica e enterohemorrágica.....	13
2.5.2.2.1.3.	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.....	14
2.5.2.2.1.4.	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....	15
2.5.3.	Resistência das bactérias aos antimicrobianos.....	15
2.5.4.	Enfermidades causadas pelos microrganismos pesquisados veiculados na carne de frango.....	18
2.6.	Análises moleculares de bactérias.....	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1.	Amostragens realizadas na cadeia produtiva de frango de corte.....	22
3.1.1.	Amostragens em frigoríficos.....	22
3.1.2.	Amostragens em granjas comerciais.....	23
3.1.3.	Amostragens de cortes de frangos congelados.....	24
3.2.	Análises microbiológicas.....	25
3.2.1.	Contagem de colônias de <i>Clostridium</i> spp. de amostras de frigoríficos.....	25
3.2.2.	Contagem de colônias de Enterobactérias de amostras de frigoríficos.....	26
3.2.3.	Análises estatísticas das contagens de colônias de <i>Clostridium</i> spp. e de Enterobactérias de amostras de frigoríficos.....	26
3.2.4.	Cultivo bacteriano para extração de DNA de amostras de frigoríficos.....	27
3.2.5.	Cultivo bacteriano a partir de amostras colhidas em granjas comerciais.....	27

3.2.6.	Cultivo bacteriano a partir de amostras de cortes de frangos congelados.....	28
3.3.	Análises moleculares.....	29
3.3.1.	Extração de DNA.....	29
3.3.2.	Detecção de <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Salmonella</i> spp. e subgrupos diarreio gênicos de <i>Escherichia coli</i> por PCR.....	30
3.3.3.	Detecção de genes codificadores de toxinas de <i>Clostridium perfringens</i> por meio da PCR multiplex.....	32
3.3.4.	Isolamento de Bacteriano.....	33
3.3.4.1.	Isolamento de <i>C. perfringens</i>	33
3.3.4.2.	Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	34
3.3.5.	Extração de DNA dos isolados para análise de perfil genético.....	35
3.3.6.	Análise do perfil genético bacteriano por Rep-PCR.....	36
3.3.7.	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1.	Análises microbiológicas.....	39
4.1.1.	Contagem de colônias de <i>Clostridium</i> spp. e de Enterobactérias de amostras de frigoríficos.....	39
4.2.	Análises moleculares.....	46
4.2.1.	Detecção de <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Salmonella</i> spp. e subgrupos diarreio gênicos de <i>Escherichia coli</i> por PCR.....	46
4.2.1.1.	Amostragens realizadas em frigoríficos.....	46
4.2.1.2.	Amostragens realizadas em granjas de frangos de corte.....	48
4.2.1.3.	Amostragens de cortes de frangos congelados.....	49
4.2.2.	Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	51
4.2.3.	Análise do perfil genético bacteriano por Rep-PCR.....	52
4.2.4.	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	58
5.	CONCLUSÃO	61
6.	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de amostras colhidas por período e o tipo de limpeza em frigoríficos.....	22
Tabela 2.	Amostragens de cortes de frangos congelados realizados em supermercados.....	25
Tabela 3.	Sequência de <i>primers</i> específicos utilizados na diferenciação dos subgrupos de <i>E. coli</i>	31
Tabela 4.	Sequência de <i>primers</i> utilizados na tipagem do <i>C. perfringens</i> , segundo Baums et al. (2004).....	32
Tabela 5.	Comparações das médias estatísticas de contagem de bactérias entre os frigoríficos e comparação entre os tipos de limpeza das esteiras em relação a todas amostragens realizadas.....	42
Tabela 6.	Comparações de médias dos desdobramentos estatísticos da contagem de <i>Clostridium</i> spp. e de Enterobactérias da interação significativa frigorífico <i>versus</i> limpeza das esteiras.....	43
Tabela 7.	Identificação das amostras positivas de cortes congelados de frangos quanto à espécie bacteriana, estabelecimento, localidade e marca.....	50
Tabela 8.	Descrição da nomenclatura dos isolados bacterianos positivos para o gene <i>eae</i> de <i>E. coli</i> , quanto a localidade e o estabelecimento amostrado.....	52
Tabela 9.	Resistência antimicrobiana dos isolados de <i>E. coli</i> enteropatogênica.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma da cadeia produtiva de aves de corte.....	5
Figura 2.	Fluxograma de abate de frangos de corte.....	6
Figura 3.	Esquema de obtenção das amostragens realizadas neste estudo.....	21
Figura 4.	Isolamento de <i>Clostridium perfringens</i> a partir de amostras colhidas em granjas, frigoríficos e supermercados, segundo o protocolo preconizado para <i>E. coli</i> pelo Reference Laboratory for Escherichia coli, (EcL), da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal, com modificações.....	33
Figura 5.	Isolamento de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas a partir de amostras colhidas em granjas, frigoríficos e supermercados, segundo o protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Epidemiologia Molecular da FCAV/UNESP Jaboticabal.....	34
Figura 6.	(A) PCR de amplificação para o gene <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> spp. de 796 pb. Não houve amostras positivas. CPS: cepa padrão de <i>Salmonella</i> Typhimurium; (B) Produtos de PCR da amplificação dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> (STEC) e <i>eae</i> (EPEC) de <i>Escherichia coli</i> , de 388pb, 807pb e 570pb, respectivamente. Foram identificadas amostras positivas apenas para o gene <i>eae</i> . CPE: cepa padrão de <i>Escherichia coli</i> . PM: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). CN: controle negativo (mix sem DNA).....	47
Figura 7.	Produtos da PCR multiplex para identificação dos tipos de <i>Clostridium perfringens</i> , A, B, C, D e E, apresentando amplificação para os genes <i>cpa</i> , <i>cpb</i> , <i>cpe</i> , <i>etx</i> e <i>iap</i> , de 900 pb, 611pb, 506 pb, 396 pb e 293 pb, respectivamente. Linha 6: amostra positiva de frigorífico. Linhas 7-10: amostras positivas de cortes de frangos. PM: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). CN: controle negativo (mix sem DNA).....	47
Figura 8.	Produto de amplificação utilizando-se os <i>primers</i> REP1R/REP2 de isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	53
Figura 9.	Produto de amplificação utilizando-se os <i>primers</i> ERIC1R/ERIC2 de isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	53
Figura 10.	Produto de amplificação utilizando-se os <i>primers</i> BOXA1R de isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	54

Figura 11.	Produto de amplificação utilizando-se os <i>primers</i> GTG ₅ de isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	54
Figura 12.	Agrupamento Neighbor-Joining resultante da análise dos marcadores moleculares REP, ERIC, BOX e GTG ₅ de isolados de <i>E. coli</i> do subgrupo EPEC, oriundos de frigoríficos, granjas e supermercados.....	55

RESUMO

A produção de aves no Brasil tem aumentado consideravelmente, impulsionada principalmente pelo consumo da carne de frango, o que gera uma preocupação com a transmissão de patógenos ao ser humano. Porém, a higienização e cuidados adequados durante toda cadeia produtiva pode-se evitar contaminações dos alimentos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de bactérias patogênicas em granjas, esteiras condutoras de cortes de frango em frigoríficos antes e após a higiene pré-operacional e operacional, e em cortes de frangos congelados adquiridos em supermercados, além de comparar geneticamente os isolados obtidos nos diferentes pontos da cadeia produtiva por sequências repetitivas utilizando a técnica Rep-PCR. Os mesmos isolados também foram submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos. Para tanto, foram realizadas contagem de Enterobactérias e de *Clostridium* spp., identificação por PCR de *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* diarreiogênicas (*E. coli* enteropatogênica - EPEC, *E. coli* shigatoxigênica - STEC, *E. coli* enteroagregativa - EAEC, *E. coli* enterotoxigênica - ETEC), e isolamento bacteriano. Para quantificação de Enterobactérias e de *Clostridium* spp., foram colhidos 311 suabes de esteiras de frigoríficos, dos quais procedeu-se, também, o cultivo bacteriano para posterior identificação das amostras por PCR espécie-específico. Em granjas comerciais, foram colhidas 164 amostras de suabes com conteúdo cloacal de frangos saudáveis e 20 amostras de cortes de frangos congelados em supermercados. Nas granjas, foram identificadas 107 amostras contendo EPEC, já nas esteiras condutoras de cortes nos frigoríficos, foram verificadas 23 amostras positivas para *E. coli* EPEC e uma para *C. perfringens*. Em cortes de frangos congelados de supermercados, foram encontradas quatro amostras contendo EPEC, duas contendo STEC e quatro positivas para *C. perfringens*. Em nenhuma amostra foi verificada a presença de *Salmonella* spp. A análise do perfil genético de 27 isolados de EPEC por Rep-PCR mostrou que houve relação genética entre isolados obtidos da mesma procedência e entre aqueles obtidos nos diferentes pontos da cadeia produtiva, indicando a ocorrência de contaminação cruzada. Todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Assim, de acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que a contaminação bacteriana está presente em diversos pontos da cadeia produtiva de frango de corte, desde a granja até o produto final. Certamente, isto mostra a importância de maiores cuidados com a higienização em todas as etapas da produção, o que possivelmente diminuirá a chance de transmissão desses patógenos para o ser humano.

Palavras Chaves: avicultura, bactérias patogênicas, diversidade genética, resistência a antimicrobianos.

Title: Quantification of Enterobacteria and *Clostridium* spp. and molecular detection of *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. at points in the chicken meat production chain.

ABSTRACT – Brazilian poultry production has been increasing significantly, mainly by the consumption of chicken meat, which leads to concern about the transmission of pathogens to human. However, proper hygiene and management in the production chain of poultry meat may avoid food bacteria contamination. Thus, this study aimed to evaluate the presence of pathogenic bacteria in poultry farms, sanitary conveyors of Brazilian slaughterhouses, before and after the pre-operational and operational hygiene, and in frozen cuts of chicken commercialized in supermarkets, beyond of comparing isolates obtained in different points of the production chain by repetitive sequences using Rep-PCR. The same isolates were also submitted to antimicrobial sensitivity test. For this, it was performed Enterobacteriaceae and *Clostridium* spp. counts, identification of *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* and diarrheagenic *Escherichia coli* (Enteropathogenic *E. coli* - EPEC, Shigatoxigenic *E. coli* - STEC, Enteroaggregative *E. coli* - EAEC, Enterotoxigenic *E. coli* - ETEC) through PCR and bacterial isolation. For quantification of Enterobacteriaceae and *Clostridium* spp. and PCR identification of pathogens, 311 samples were collected from sanitary conveyors using sterile swabs. From poultry farms, 164 samples of cloacal content swabs were collected from healthy chickens, and 20 samples of frozen chicken cuts were taken from supermarkets. In commercial poultry farms, 107 positives samples for EPEC were identified. Similarly, it was found 23 positive samples for EPEC and one for *C. perfringens* in sanitary conveyor at chicken slaughterhouses. In cuts of chicken from supermarkets, it was found four positive samples for EPEC, two for STEC and four for *C. perfringens*. No samples were diagnosed with the presence of *Salmonella* spp.. The genetic profile analysis of 27 EPEC strains showed that there was a genetic relationship among isolates from the same origin and among those obtained from different points of the production chain, which is an indicative of cross contamination. All isolates are resistant to at least one antimicrobial. Thus, according to the results obtained, it was attested that bacterial contamination might be present in various points of the poultry meat production chain, from the poultry farms to the final product. Certainly, it denotes the importance of enhanced care with the hygiene and management in all stages of the meat production, which possible will reduce the chance of these harmful pathogens transmission to human.

Keywords: poultry production, pathogenic bacteria, genetic diversity, antimicrobial resistance.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da avicultura brasileira teve início a partir da década de 1950, período no qual houve uma modificação no sistema de produção de carne de frango, que anteriormente era realizado artesanalmente com a produção do frango caipira (BELUSSO; HESPANHOL, 2010; VASCONCELOS et al., 2015). A produção em larga escala de frango começou a partir da importação de novas linhagens, com modernizações nos setores da genética, sanidade e nutrição, e com a introdução de instalações tecnificadas (TAVARES; RIBEIRO, 2007).

Segundo dados do Relatório Anual da Associação Brasileira da Proteína Animal – ABPA (2015), em 2014, a avicultura industrial brasileira ocupou o primeiro lugar no *ranking* mundial como exportador de carne de frango, comercializando 4,09 milhões de toneladas. Em 2015, a estimativa é que houve um crescimento da produção da carne de frango de 3,58% em relação ao ano anterior, com o equivalente a 13,146 milhões de toneladas, fazendo com que o Brasil ultrapasse a produção da China (ABPA, 2016).

Com o aumento na produção da carne de frango, intensificou-se a preocupação com a veiculação de microrganismos prejudiciais à saúde humana em alimentos. Uma das maneiras de se evitar a contaminação por microrganismos patogênicos, é a higienização adequada durante toda a cadeia produtiva de carne de frango (PINTO, 1996; SOUZA, 2014).

As principais toxinfecções alimentares são causadas por bactérias, como *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, entre outros. Os

alimentos de origem animal, possuem nutrientes suficientes para a multiplicação de tais patógenos, sendo que as contaminações podem ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva, chegando ao produto final, o que pode ocasionar prejuízos econômicos e danos à saúde humana (FLORES; MELO, 2015).

Com o desenvolvimento da biologia molecular, a detecção e identificação de microrganismos e de genes específicos, seja por meio de *primers* específicos ou por sequenciamento de fragmentos de DNA, tem sido largamente aplicada na microbiologia, devido a obtenção de resultados em menor tempo e com maior eficácia (BARGHOUTH, 2011). A técnica de marcadores moleculares por Rep-PCR, por exemplo, tem ajudado no estudo da diversidade genética bacteriana, demonstrando que é possível encontrar variabilidade genética em isolados da mesma espécie bacteriana (ALBUFERA et al., 2007; CHAPAVAL et al., 2010).

Diante o exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a higiene pré-operacional e operacional de esteiras condutoras de cortes de frango em frigoríficos localizados na região Sudeste do Brasil, por meio da quantificação de colônias bacterianas de Enterobactérias e *Clostridium* spp., e identificação de *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreiogênicas, sendo a shigatoxigênica (STEC), enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC) e enteroagregativa (EAEC) por PCR. Adicionalmente, tal pesquisa de patógenos foi realizada em granjas comerciais de frangos de corte e em cortes de frangos congelados comercializados em supermercados. A fim de verificar a presença de diversidade genética em diversos pontos a cadeia produtiva da carne de frango, o perfil genético dos isolados bacterianos obtidos foram analisados por Rep-PCR. Além disso, todos os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Avicultura

A avicultura no Brasil começou sua modernização a partir da década de 1950, em que a criação avícola familiar em pequenas propriedades, tornou-se uma criação industrial com produção em larga escala (BELUSSO; HESPANHOL, 2010; VASCONCELOS et al., 2015). Essa modernização ocorreu principalmente pela importação de novas linhagens de frango e em melhorias nos setores de genética, sanidade, nutrição das aves e na introdução de instalações tecnificadas (TAVARES; RIBEIRO, 2007).

Essa mudança na avicultura ocorreu, principalmente, devido ao aumento do consumo da carne de frango no Brasil, no qual esse consumo médio per capita era de 11,80kg/ano, em 1988, e passou para 42,78kg/ano, em 2014 (ABPA, 2015). Segundo a Departamento de Agricultura dos EUA, em 2014, o consumo médio mundial da carne de frango foi de 38,42kg/pessoa.

Atualmente, a agropecuária brasileira corresponde a 23% do produto interno bruto (PIB) total da economia, sendo que a avicultura representa cerca de 1,5%, além de empregar cerca de 3,6 milhões de pessoas, demonstrando a importância desse setor agropecuário (ABPA, 2012).

O setor avícola é importante para todos os países do mundo, principalmente para os que estão localizados no Sul da Ásia e na África os quais enfrentam graves problemas por falta de alimentos. A avicultura representa, neste cenário, o fornecimento de uma proteína animal de boa qualidade, com altos níveis de vitaminas e minerais para todo o mundo (FARRELL, 2013).

Uma das grandes preocupações da cadeia produtiva de aves é a obtenção de produtos e subprodutos, tais como a carne e os cortes de frangos com baixos níveis de contaminação, visando evitar prejuízos econômicos e risco à saúde pública (SOUZA et al., 2014).

2.2. Cadeia produtiva de aves de corte

A posição de destaque do Brasil no cenário mundial de produção de carne de frango é devido às modernizações em toda a cadeia produtiva, sendo aplicadas desde as granjas até os frigoríficos, além das tecnificações que ocorreram em toda a área de processamento de carnes, as quais ajudaram a aumentar o volume no abate e na produção de cortes de aves, para que o país conseguisse atender as demandas dos mercados nacional e internacional (SOARES et al., 2014). Em 2014, os aviários, abrigaram cerca de 6.226,2 milhões de cabeças de frango, o que demonstra a importância do setor avícola para a economia brasileira (AVISITE, 2015).

Outro ponto que contribuiu para a sustentabilidade da avicultura brasileira foi o desenvolvimento do mercado, cujas relações entre a unidade produtiva e a indústria se estreitaram, criando um sistema de integração avícola denominado produção integrada, na qual há benefício para ambas as partes (FREITAS; BERTOGLIO, 2001). Com a estruturação e o alto nível de coordenação, o mercado avícola brasileiro tornou-se um grande competidor no mercado mundial (ARAÚJO et al., 2008). Atualmente, o Brasil exporta carne de frango para mais de 140 países, sendo a Ásia e a União Européia os maiores compradores (ABPA, 2015).

Nos dias atuais, a estruturação da cadeia produtiva de frango de corte é constituída por dois elos, sendo o principal representado pelo avozeiro, matrizeiro,

incubatório, aviário, frigorífico varejista e consumidor final; e o auxiliar, composto por pesquisa e desenvolvimento genético, medicamentos, milho, soja e outros insumos, equipamentos e embalagens (Figura 1) (ARAÚJO et al., 2008; VOILÀ; TRINCHES, 2013).

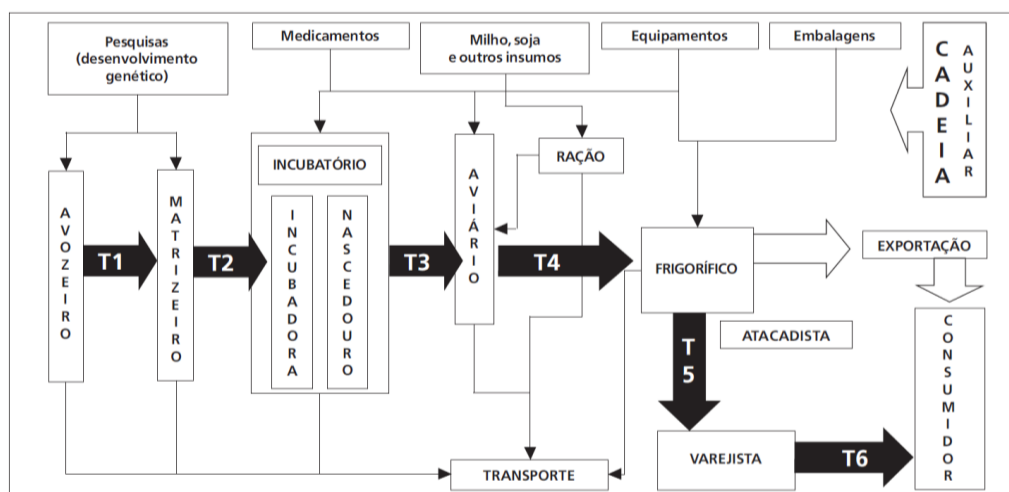


Figura 1. Fluxograma da cadeia produtiva de aves de corte. Fonte: PAIVA et al., 2005 citado por ARAÚJO et al, 2008.

2.3. Processamento da carne de frango

No Brasil, todo e qualquer processamento de alimentos é fiscalizado por órgãos vinculados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para os alimentos de origem animal, há um departamento específico denominado Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), o qual é responsável por assegurar a qualidade de produtos destinados ao mercado interno e externo (BRASIL, 2015a).

No caso específico do processamento da carne de frango, há dois regulamentos, criados pelo DIPOA, que devem ser obrigatoriamente seguidos pelos abatedouros, o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Sanitária de Carnes de Aves (BRASIL, 1998) e o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de

Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2008). Estes regulamentos abrangem questões referentes ao pré-abate e ao abate, que consistem nas etapas de insensibilização, sangria, escalda, depenagem, evisceração, pré-resfriamento, resfriamento, gotejamento, classificação, embalagem, tempo de armazenamento e comercialização (Figura 2).

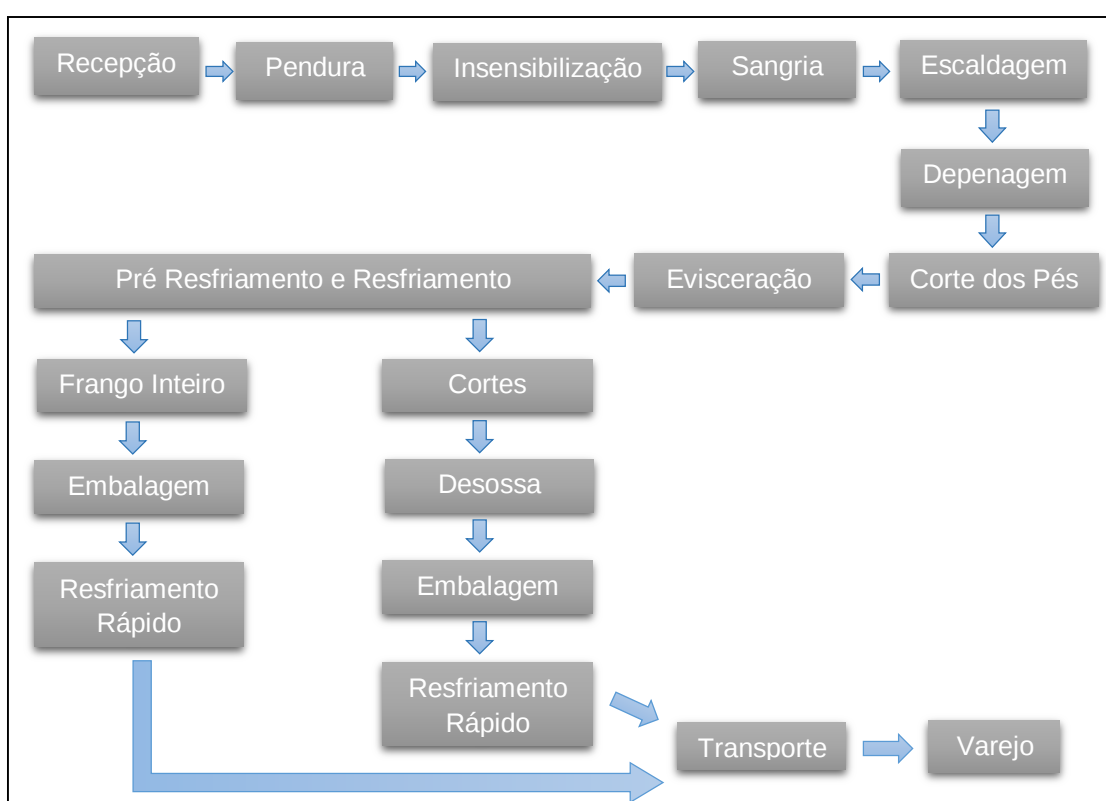


Figura 2. Fluxograma de abate de frangos de corte.

Segundo as normas da Portaria nº 210 (BRASIL, 1998), os frigoríficos que realizam cortes e/ou desossa de aves, devem possuir uma seção exclusiva e separada dos demais setores, além de ser climatizada com temperatura não superior a 12°C. As esteiras condutoras dos cortes de frango, por sua vez, devem ser de aço inoxidável ou de um material resistente denominado “borracha sanitária”, sem bordas e de coloração clara.

O protocolo de limpeza dessas esteiras está descrito em um programa específico que deve ser seguido pelos frigoríficos, o qual é denominado de Limpeza e Sanitização (Procedimentos Padrões de Higiene Operacional – PPHO), que abrange os procedimentos de higienização executados antes do início das operações, denominados pré-operacionais, e durante as mesmas, os operacionais (BRASIL, 2005).

Na higienização pré-operacional ocorre a limpeza e sanitização nos ambientes e equipamentos, incluindo o total esvaziamento dos tanques do sistema de pré-resfriamento e a limpeza das esteiras condutoras de cortes de frango. Para tanto, é necessário efetuar a remoção dos resíduos, o enxágue com água sobre pressão e temperatura entre 45°C e 50°C, seguido da aplicação de detergente, esfrega e um novo enxágue com água sobre pressão na mesma temperatura. Posteriormente, é realizada a aplicação de sanitizante, aprovado pelo MAPA como o amônio quaternário, ácido acético, dentre outros, com tempo de ação de, no mínimo, 15 minutos e, por último, um enxágue com água sobre pressão nas mesmas condições.

Já na higienização operacional, a limpeza é efetuada também nos ambientes e equipamentos, incluindo as esteiras, sendo que este procedimento só deve ser realizado em frigoríficos que possuem mais de um turno de trabalho (BRASIL, 2001). Tal higienização compreende somente a remoção dos resíduos com o enxágue de água sobre pressão com temperatura variando entre 45°C a 50°C. De acordo com a Portaria nº 210 do MAPA, água potável é aquela que possui inocuidade microbiológica e contém de 0,5mg/L até 2,0mg/L de cloro livre (BRASIL, 1998).

Segundo Thévenot et al. (2005), a higienização somente com água sobre pressão tem por finalidade evitar a contaminação do alimento que entra em contato

com a superfície da esteira. No entanto, alguns autores consideram que a água poderia permitir a disseminação de microrganismos na esteira e no ambiente por meio da liberação de aerossóis e, assim, contaminar outras carcaças que entrarem em contato com este ambiente (SOARES et al., 2014).

Há na indústria alimentícia a prevalência de alguns microrganismos nocivos à saúde humana, que são causadores das toxinfecções alimentares, dentre estes podemos citar *E. coli* diarreiogênica, *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *C. perfringens*, *Campylobacter jejuni* e *Shigella* spp. (CDC, 2013). Para que a indústria garanta a qualidade de seus produtos, é necessário que a higienização no ambiente e equipamentos seja realizada de maneira criteriosa, conforme as normas estabelecidas pelo MAPA (FLORES; MELO, 2015).

2.4. Padrões microbiológicos exigidos para comercialização de carne de frango e derivados

Para a comercialização da carne de frango no mercado interno e externo, há várias normas que devem ser seguidas para certificar a ausência de quaisquer microrganismos e/ou substâncias que possam causar danos à saúde. Algumas dessas exigências são quanto aos padrões microbiológicos, podendo ser impostas tanto pelo mercado interno como pelos países importadores. Um exemplo é a legislação estabelecida pelos EUA, que exige testes microbiológicos diários para *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e também para *Listeria* spp.. Já no caso da União Européia, os testes exigidos são de contagem total de mesófilos e *Enterobacteriaceae*, sendo realizadas amostragens semanais (BRASIL, 2005).

A legislação brasileira determina que antes da carne de frango chegar ao consumidor final, os frigoríficos devem submeter estes produtos a testes de presença de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp., além de realizar a contagem de coliformes termotolerantes, de clostrídios sulfito-redutores e de *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2001).

O consumidor final está cada vez mais informado e preocupado com sua saúde. Assim, é de suma importância que o produto final chegue à mesa do consumidor sem a presença de quaisquer patógenos (ROSA et al., 2013). Porém no Brasil, e também em outros países, é possível encontrar na carne de frango, bactérias que causam toxinfecções alimentares, tais como *Salmonella* spp., *E. coli* patogênica, *C. perfringens* e *Campylobacter* spp. (ZHAO et al., 2001; ARAS; HADIMLI, 2015).

2.5. Principais bactérias patogênicas encontradas na carne de frango

2.5.1. *Clostridium* spp.

Clostridium spp. é uma bactéria Gram positiva, em forma de bastonetes, produtora de esporos e consequentemente, altamente resistente. Muitas espécies de *Clostridium* spp. produzem potentes toxinas, como é o caso do *C. perfringens*, que pode provocar gangrena gasosa e a intoxicação *alimentar* no ser humano e a enterite necrótica em aves, e do *C. botulinum*, que é responsável pelo botulismo em humanos e animais (DÜRRE, 2005).

2.5.1.1. *Clostridium perfringens*

C. perfringens é anaeróbio, capaz de produzir toxinas, e pode ser encontrada no solo, em grãos, no trato gastrointestinal dos animais e até mesmo do ser humano (TORTORA, 2005; GOMES, 2007).

As estirpes de *C. perfringens* são classificadas em cinco tipos A, B, C, D e E, de acordo com as toxinas que são produzidas por cada tipo, sendo estas denominadas *alfa*, *beta*, *épsilon* e *iota*, além das enterotoxinas (HEIKINHEIMO et al., 2009). Assim, o tipo A é capaz de produzir somente a toxina *alfa*, já o B produz as toxinas *alfa*, *beta*, *épsilon*, o tipo C produz as toxinas *alfa* e *beta*, o D produz as toxinas *alfa* e *épsilon* e o tipo E produz as toxinas *alfa* e *iota*. Os genes codificadores das toxinas *alfa*, *beta*, *épsilon*, *iota* e das enterotoxinas são *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap* e *cpe*, respectivamente (BAUMS et al., 2004).

Contaminações por *C. perfringens*, ocasionam intoxicação alimentar no ser humano e enterite necrótica em aves, além de enterotoxemias e gangrena gasosa, caso ocorra o contato com um ferimento, em seres humanos e animais (NILLO, 1980). De acordo com Schocken-Iturrino et al. (2009), a enterite necrótica em aves é causada pelo *C. perfringens* dos tipos A e C, que ocasionam enormes perdas econômicas na avicultura. Além dos prejuízos econômicos, esta bactéria é capaz de provocar toxinfecções a partir da ingestão de carne *in natura* contaminada, principalmente de origem avícola e bovina (CDC, 2015).

2.5.2. Enterobactérias

A família *Enterobacteriaceae* constitui um grande grupo heterogêneo de bactérias Gram negativas que podem ser encontrados no solo, na água e na

vegetação, além de serem comumente encontradas na microbiota intestinal dos animais e do ser humano (PUERTA-GARCÍA; MATEOS-RODRÍGUEZ, 2010).

Os principais gêneros que compõe esta família são *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp., *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Yersinia* spp. e *Escherichia* spp.. (KONEMAN et al., 2012). Dentre estes gêneros, os que mais se destacam por causarem doenças, tanto em humanos como animais, são *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *Shigella* spp. (BRASIL, 2013).

2.5.2.1. *Salmonella* spp.

Salmonella spp. são bactérias em forma de bastonetes Gram negativos, não produz esporos, são anaeróbias facultativas e quase todas as espécies possuem flagelos (TESSARI et al., 2003). Atualmente, este gênero é dividido em duas espécies *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo a *Salmonella enterica* subdividida em seis subespécies Enterica, Salamae, Arizonae, Diarizonae, Houtenae e Indica (SANDERSON; NAIR, 2013).

Este microrganismo tem grande importância mundial, por se tratar de uma espécie causadora de importantes surtos de toxinfecções alimentares em seres humanos, sendo estes associados a ingestão de alimentos contaminados, principalmente os de origem animal, sendo um risco para a saúde pública (TESSARI et al., 2003).

Esta bactéria também pode infectar várias espécies animais e pode ser encontrada no trato gastrointestinal de mamíferos, répteis, aves e até de insetos

(CARDOSO; TESSARI, 2008). Em aves, a infecção por *Salmonella* spp. pode causar prejuízos na produção, mortalidade dos animais, além de contaminar os produtos que são direcionados ao consumo humano, o que, conseqüentemente, provoca prejuízos financeiros e riscos à saúde humana (GIL DE LOS SANTOS; GIL-TURNES, 2005).

2.5.2.2. *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* pode ser ou não causador de doenças, no entanto, os sorotipos causadores de enfermidades são de suma importância para a saúde pública e para a sanidade dos animais. A bactéria *E. coli* é um bastonete Gram negativo, não esporulado, flagelado, anaeróbio facultativo (TRABULSI et al., 2002), sendo que dentro deste grupo há cepas altamente patogênicas, tais como a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), dentre outras (CDC, 2015).

2.5.2.2.1. Classificação em patótipos de *E. coli*

Os isolados de *E. coli* patogênicos são classificados de acordo com sua patogenicidade, sendo assim, avaliados conforme seus fatores de virulência e mecanismos pelos quais provocam doenças tanto em humanos como em animais (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014).

Estas bactérias também são divididas em dois grandes grupos, *E. coli* diarreiogênica, aquela que provoca alterações intestinais, como a diarreia, e *E. coli* extraintestinais (ExPEC), que atuam fora do intestino, ocasionando outros tipos de

doença como a síndrome do trato urinário (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; CROXEN; FINLAY, 2010).

Algumas *E. coli* diarreiogênicas são transmitidas ao ser humano pelo alimento e podem ocasionar toxinfecções, tais como EPEC, STEC, EHEC, EAEC e a ETEC.

2.5.2.2.1.1. *Escherichia coli* enteropatogênica

A EPEC causa diarreia aquosa com presença de muco, acompanhada de vômitos e febre, acometendo, principalmente crianças com até um ano de idade e animais jovens (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; KONEMAN et al., 2012).

A colonização por EPECs ocorre nas microvilosidades do intestino, principalmente no delgado, onde provocam uma lesão característica fazendo com que os microvilos se unam ou desapareçam, levando a diarreia crônica e consequentemente a má absorção dos nutrientes, o que ocasiona perda de peso e, no caso de criança, retardo no crescimento (ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA; TORRES, 2012).

As EPECs não produzem nenhum tipo de toxina. Seu gene para virulência, *eae*, encontra-se no *locus of enterocyte effacement* (LEE), em uma ilha de patogenicidade (PAI) e é responsável pela produção de hemolisinas e fímbrias P (CROXEN; FINLAY, 2010).

2.5.2.2.1.2. *Escherichia coli* shigatoxigênica e enterohemorrágica

E. coli shigatoxigênica produz ao menos uma das toxinas Shiga, *stx1* ou *stx2*, já a EHEC produz as duas Shiga toxinas (GYLES, 2007), além de possuir a ilha de

patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*), assim como o patótipo EPEC (COURA; LAGES; HEINEMANN, 2014).

As cepas de STEC podem causar diarreia aquosa e sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e até a morte, já que suas toxinas atuam na destruição das células epiteliais dos tecidos (PUERTA-GARCÍA; MATEOS-RODRÍGUEZ, 2010).

As cepas de EHECs causam, tanto em humanos como em animais, severas patologias no intestino grosso, como diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urêmica e púrpura trombótica trombocitopênica. Em suínos, ocasionam uma enfermidade específica denominada Doença do Edema (CROXEN; FINLAY, 2010).

Há espécies animais que são considerados portadores assintomáticos de EHEC, e, portanto, reservatórios desse patótipo, como é o caso dos bovinos (GYLES, 2007). Por isso, os surtos por este patótipo podem estar associados ao consumo de vários tipos de alimentos como carnes bovinas moídas, suínas e de frango, além de hambúrgueres malcozidos, salsichas, leite não pasteurizado, alface e suco de maçã não pasteurizado (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MAGWEDERE, 2013; COURA; LAGE; HEIMANN, 2014).

2.5.2.2.1.3. *Escherichia coli* enteroagregativa

Este patótipo de *E. coli* também causa doenças intestinais tanto no ser humano como nos animais. As EAECs colonizam o intestino, principalmente o cólon, ocasionando diarreia aquosa, acompanhada ou não de muco e podendo ter duração de mais de 14 dias (CROXEN; FINLAY, 2010).

O subgrupo EAEC é capaz de produzir citotoxinas e enterotoxinas, possuindo fímbrias de aderência agregativa do tipo I-IV (AAFI-IV), as quais são expressas pelos genes presentes no plasmídeo de adesão agregativa (pAA) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; CROXEN; FINLAY, 2010).

2.5.2.2.1.4. *Escherichia coli* enterotoxigênica

Em humanos e animais, as cepas de ETECs colonizam o intestino delgado ocasionando, também a diarreia aquosa, semelhante à da *Vibrio cholerae*, além de provocar cólicas abdominais leves, vômitos e desidratação (KONEMAN et al., 2012). Sua colonização ocorre por aderência, principalmente na mucosa do intestino delgado, sem penetrá-la, causando diarreia (CROXEN; FINLAY, 2010).

As enterotoxinas, por sua vez, são responsáveis por atuar no tecido intestinal. Essas toxinas são divididas em dois tipos, as termoestáveis (ST) e termolábeis (LT), ambas modificam as funções dos enterócitos, aumentando a secreção e diminuindo a absorção de líquidos, sem alterarem morfológicamente as células intestinais (NAGY; FEKETE, 2005; COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014).

As toxinas termoestáveis são denominadas STaP, STaH e STb, dependendo da origem da ETEC. Por exemplo a STaP é produzida pelos animais e a STaH por seres humanos. Já as termolábeis são divididas em LTI e LTII, podendo ter subdivisões de acordo com sua fonte, seres humanos ou animais (MAINIL, 2013).

2.5.3. Resistência das bactérias aos antimicrobianos

O uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento de doenças humanas e animais tem aumentado o surgimento de bactérias resistentes, comprometendo a

saúde dos hospedeiros, já que estes microrganismos são dificilmente eliminados por estas drogas (BLAAK et al., 2015). Estas bactérias podem estar presentes em quaisquer fontes, porém o maior risco de contaminação ocorre a partir da ingestão de água não potável e de alimentos, tanto de origem animal como de origem vegetal (SAYAH et al., 2005; PRIÓ et al., 2006).

Outro problema relacionado ao uso excessivo de antimicrobianos é a contaminação do meio ambiente, sendo estas substâncias disseminadas no solo e nas águas superficiais (KUMMERER, 2004).

Os antimicrobianos utilizados nos tratamentos de doenças podem ser separados em diversos grupos, tais como β -lactâmicos, Quinolonas, Glicopeptídeos, Oxazolidinonas, Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Lincosaminas, Nitroimidazólicos, Cloranfenicol, Estreptograminas, Sulfonamidas, Tetraciclina, além dos novos grupos que são as Gliciclinas, Polimixinas, Daptomicina e a Gemifloxacina (BRASIL, 2015b).

Na avicultura, os antimicrobianos, além de serem utilizados para o tratamento de doenças, estes são usados como promotores de crescimento auxiliando no aumento do desempenho zootécnico e na produtividade das aves (ANDERSON et al, 1999; KURITZA et al., 2014).

A bactéria *E. coli* resistente pode ser encontrada em qualquer hospedeiro, tanto em animais como em humanos (SAYAH et al., 2005). De acordo com Obeng et al. (2012), *E. coli* resistentes a tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, estreptomicina, espectinomicina e a floranfenicol foram encontradas em amostras de carne de frango e em ovos. Também foram encontradas *E. coli* resistentes a ampicilina, tetraciclina e sulfonamida em amostras de fezes colhidas de humanos e animais, como de bovinos, suínos e aves de corte (TADESSE et al., 2012). Algumas

cepas de *E. coli* podem ser resistentes a mais de um antibiótico, de acordo com o estudo realizado por Okamoto et al. (2012), que avaliaram a resistência antimicrobianas em isolados do intestino de galinhas de postura saudáveis.

Em *Salmonella* foi possível verificar tal resistência a estreptomicina, tetraciclina e sulfazotrim em 100% das amostras do sorovar Hadar isoladas a partir de carcaças de frango congeladas (RIBEIRO et al., 2006). Em outro estudo, a presença de *Salmonella* spp. resistentes a antimicrobianos foi verificada em aviários, sendo os isolados desta bactéria resistentes a um ou mais antimicrobianos, principalmente a tetraciclina (PANDINI et al., 2014).

Em *C. perfringens*, a resistência antimicrobiana também foi encontrada, em um estudo realizado em suínos, no qual esta bactéria foi resistentes ao ceftiofur, a enrofloxacina, a eritromicina, a lincomicina e a tilosina (NGAMWONGSATIT et al., 2016). Já em amostras de carnes de búfalo, cabra e frango, os isolados de *C. perfringens* apresentaram resistência a estreptomicina, a ceftazidima, ao sulfato de colistina, a cefalotina, a ampicilina e a gentamicina (SINGH; BHILEGAONKAR; AGARWAL, 2005).

Devido à periculosidade de ocorrer uma grande proliferação e surgimento de mais bactérias resistentes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) está trabalhando em prol de diminuir o uso excessivo de antibióticos (BRASIL, 2015b). Pelo mesmo motivo, alguns países, como a União Europeia, proibiram o uso dessas drogas na nutrição animal (EC, 2003; KURITZA et al., 2014).

2.5.4. Enfermidades causadas pelos microrganismos pesquisados veiculados na carne de frango

A pesquisa e o controle de patógenos na produção de carne de frango é de suma importância para a economia brasileira, já que a qualidade da carne e as características sanitárias são os aspectos que mais influenciam nas transações internacionais. O cumprimento das normas exigidas no exterior é de grande valia, pois se a qualidade da carne não estiver de acordo com os padrões do país importador, a exportação brasileira é prejudicada, gerando, assim, um grande impacto econômico em um dos setores agropecuários que mais gera renda ao país (JUNIOR et al., 2007).

Do ponto de vista da saúde pública, o consumo de carne de frango está diretamente relacionado com os surtos de toxinfecções alimentares em humanos. Dentre as bactérias envolvidas nesses surtos estão as *Salmonella* spp., as *E. coli* diarreiogênicas e o *C. perfringens*, que podem ser encontradas no intestino de aves, e, com a evisceração incorreta, contaminam as carcaças, e as esteiras condutoras de cortes de frango (CDC, 2016).

Segundo estimativas do *Center of Diseases Control and Prevention* (CDC), a cada ano, nos EUA, 48 milhões de pessoas contraem toxinfecções por consumo de alimentos contaminados, dentre as quais 128.000 pessoas são hospitalizadas e 3.000 morrem (CDC, 2015).

As principais toxinfecções ocorridas nos EUA são causadas por *Campylobacter* spp., *C. perfringens*, *Listeria* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* diarreiogênicas. O número de casos de toxinfecções alimentares, causados por *C. perfringens* e *Salmonella* spp., é de 1 milhão por ano cada, já a *E. coli* diarreiogênicas é responsável por aproximadamente 81 mil casos de toxinfecções, sendo *E. coli*

Enterotoxigênica (ETEC) a principal causadora (CDC, 2015). No Brasil, não há relatos sobre a veiculação bacteriana através de produtos de origem animal, isso ocorre pela escassez de diagnósticos rápidos para infecções bacterianas e também pela não notificação dessas infecções.

2.6. Análises moleculares de bactérias

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares, a detecção e identificação de espécies de microrganismos e genes específicos tem sido cada vez mais aplicadas na microbiologia, devido a obtenção de resultados com maior acurácia e em menor tempo (BARGHOUTH, 2011). Identificação de *Salmonella* spp., *E. coli* e *C. perfringens* de diversas fontes por meio de PCR, tem sido largamente citada na literatura (ZHAO et al., 2001; ARAS; HADIMLI, 2015).

A modernização das técnicas moleculares permitiu o estudo do polimorfismo entre indivíduos geneticamente relacionados mediante a aplicação de marcadores moleculares tais como RFLP¹, RAPD², AFLP³, Rep-PCR⁴ e SSR⁵ (SABAT et al., 2013). Dentre estes, destaca-se a técnica de Rep-PCR, que engloba a utilização dos marcadores REP, ERIC, BOX, e consiste na análise de perfis genéticos de isolados bacterianos. Nesta técnica, o fragmento de DNA flanqueado por *primers* específicos, localizado entre os elementos repetitivos, é amplificado por PCR e os padrões de bandejamento de cada isolado, obtidos por eletroforese, são comparados a fim de se determinar a relação genética entre os mesmos (VERSALOVIC et al., 1991).

¹ Restriction Fragment Length Polymorphism

² Random Amplified Polymorphic DNA

³ Amplified Fragment Length Polymorphism

⁴ Repetitive-element Polymerase Chain Reaction

⁵ Simple Sequence Repeats

Há três iniciadores que são mais utilizados para o emprego dessa técnica, o REP com elementos repetitivos de 35-40 pb (VERSALOVIC et al., 1991), ERIC⁶ com elementos de 124-127 pb (VERSALOVIC et al., 1991) e BOX, cujas subunidades são BOX A (57 pb), BOX B (43 pb) e BOX C (50 pb), aplicadas especificadamente para cada grupo bacteriano (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995).

A técnica de Rep-PCR tem demonstrado ter reprodutibilidade, tipabilidade, estabilidade e alta qualidade discriminatória, além de ser versátil para estudos epidemiológicos a fim de se estudar as relações entre estirpes bacterianas (ISHII; SADOWSKY, 2009; CHAPPAVAL et al., 2010).

Esta técnica pode ser aplicada em diversos microrganismos, tais como *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella* spp. (CHERIF et al., 2003; ALBUFERA et al., 2007; CHAPPAVAL et al., 2010). Para *E. coli*, marcadores Rep-PCR possuem alto potencial discriminatório. De acordo com Wan et al. (2012), esta técnica foi altamente eficiente em demonstrar a variabilidade genética dos isolados de *E. coli* em suínos. E outro estudo desenvolvido por Soltani et al. (2012), também evidenciou um elevado grau de polimorfismo entre *E. coli* isoladas de aves de corte.

⁶ Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Anaeróbios, do Departamento de Patologia Veterinária e do Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal. As amostragens deste estudo foram colhidas em diversos pontos da cadeia produtiva de carne de frango, conforme demonstrado na Figura 3.

As amostras foram nomeadas de acordo com a sua procedência, granja (PF), frigorífico (SH) e supermercado (M), seguido pelo número referente ao estabelecimento, número da amostragem.

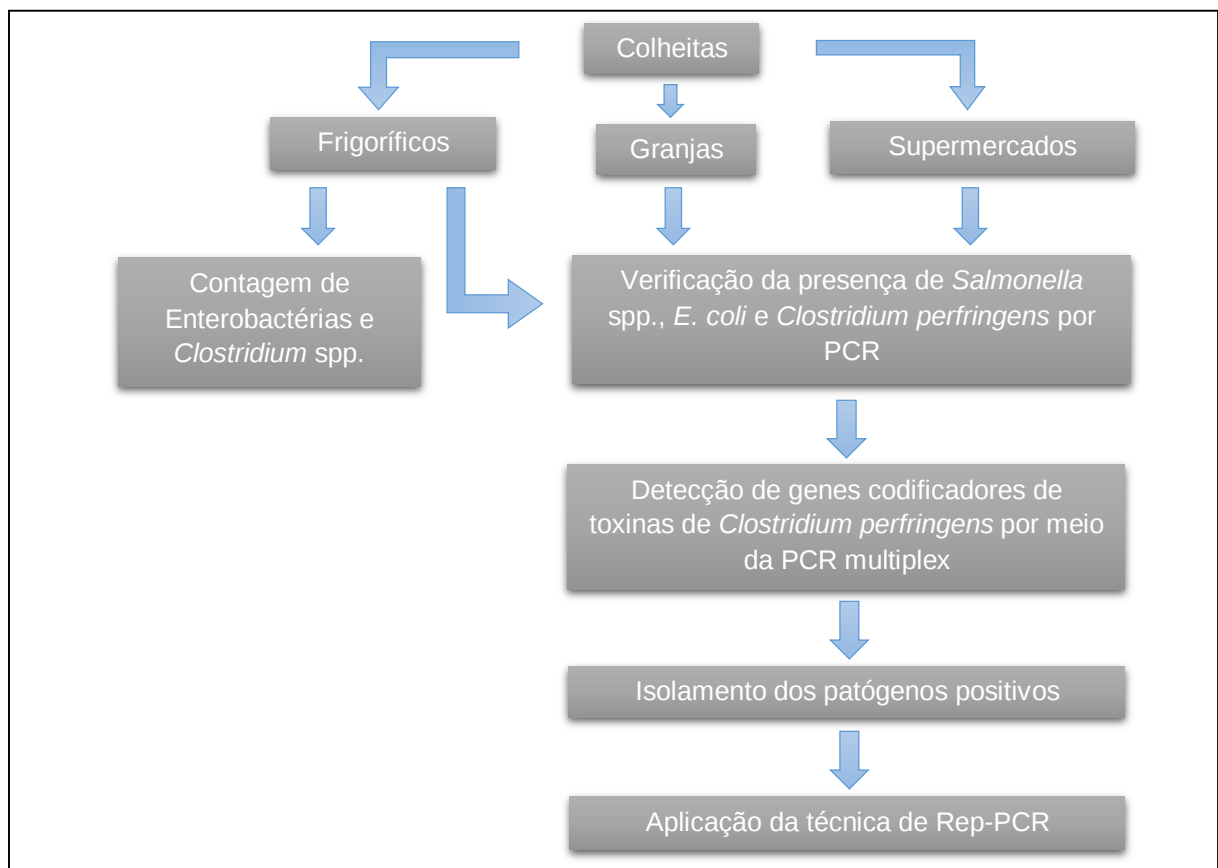


Figura 3. Esquema de obtenção das amostragens realizadas neste estudo.

3.1. Amostragens realizadas na cadeia produtiva de frango de corte

3.1.1. Amostragens em frigoríficos

Foram realizadas seis colheitas, em três frigoríficos de aves, localizados no interior do Estado de São Paulo, nas regiões de Campinas e Monte Alto e na região de Passos, sul de Minas Gerais. As amostragens foram efetuadas em superfície de esteiras antes e após o processo de higienização por aspersão contínua de água nas mesmas, totalizando 311 amostras (Tabela 1). As amostragens nesses estabelecimentos não obedeceram a um critério específico de tempo, ou seja, essas amostragens ocorreram com alguns meses de diferença.

Tabela 1. Número de amostras colhidas por período e o tipo de limpeza em frigoríficos.

Amostragem em frigoríficos							
Frigorífico ¹	Localização	Mês da coleta	Antes da LPO ²	Após da LPO	Antes da LO	Após da LO	Nº total de amostras
SH1.S1	Passos/MG	Jun/2013	12	12	12	12	48
SH1.S2	Passos/MG	Dez/2013	15	15	15	15	60
SH1.S3	Passos/MG	Ago/2014	15	15	15	15	60
SH2.S1	Monte Alto/SP	Ago/2013	18	18	Não houve ³	Não houve ³	36
SH3.S1	Campinas/SP	Set/2013	13	13	13	13	52
SH3.S2	Campinas/SP	Nov/2013	14	14	14	13	55

¹SH (Slaughterhouse) – Frigorífico, S (Samples) – Amostragem. ²LPO – Limpeza pré-operacional, LO – Limpeza operacional. ³O estabelecimento SH2.S1, localizado na região de Monte Alto/SP, funciona em apenas um turno, não havendo assim a necessidade da realização da limpeza operacional, de acordo com a Portaria nº 210/1998 do MAPA.

As amostras foram colhidas, utilizando-se, simultaneamente, dois suabes estéreis por área pré-determinada da esteira, de 20cm², com auxílio de um gabarito metálico, previamente esterilizado. As amostragens foram realizadas sucessivamente antes e após a limpeza pré-operacional e operacional.

Um suabe de cada amostra foi acondicionado em tubo de ensaio contendo 10mL de solução peptonada 0,1% e o outro foi depositado diretamente em um tubo

contendo 5,0mL de caldo BHI⁷. As amostras foram transportadas em caixa isotérmica com temperatura de aproximadamente 4°C até o laboratório para a realização das análises até quatro horas após a colheita.

Segundo a Normativa nº210 do MAPA, a higienização é realizada em duas etapas, sendo denominada de limpeza pré-operacional, aquela que é realizada após o término de cada turno, com o uso de detergentes, ácidos orgânicos e aspersão de água sob pressão, o enxague é necessário para que tais resíduos não entrem em contato com a carne, já a limpeza operacional é utilizada somente a aspersão de água sob pressão nas esteiras para a remoção de resíduos de carcaças (BRASIL, 1998). Ainda de acordo com mesma normativa, os estabelecimentos que apresentam apenas um turno de trabalho não tem a necessidade de realizar ambas as limpezas, sendo requerido somente a limpeza pré-operacional. Dentre os seis frigoríficos visitados neste estudo, somente o segundo frigorífico não possuía dois turnos de trabalho.

3.1.2. Amostragens em granjas comerciais

Tendo em vista os resultados positivos apresentados na realização do experimento piloto realizado em uma granja comercial, procedeu-se a colheita programada para compor o desenvolvimento do projeto.

Para tanto, a primeira colheita em granja comercial foi realizada na região de Jaboticabal/SP. Excreções das cloacas de frangos saudáveis, destinados ao consumo humano, foram amostradas com o auxílio de suabes estéreis, totalizando 60 amostras. Uma segunda amostragem, da mesma maneira, foi realizada na região de Monte Alto/SP, na qual foram colhidas 104 amostras.

⁷ Brain Heart Infusion (Merck)

Em ambas as amostragens foram realizadas colheitas de maneira aleatória, de modo que o galpão foi dividido em três partes, e cada parte, foi subdividida em outras três partes, sendo colhidas na primeira amostragem aproximadamente 6 suabes de conteúdo cloacal por subparcela, já na segunda amostragem foram colhidas aproximadamente 11 por subparcela. Os suabes foram alocados individualmente em tubos contendo 3,0mL de caldo BHI, os quais foram transportados em caixas térmicas a 4°C.

3.1.3. Amostragens de cortes de frangos congelados

Cortes de frangos, tais como tulipas, coxas, sobrecoxas e coxinhas das asas, entram em contato com as esteiras de frigoríficos, que podem conter possíveis contaminações. Foram realizadas colheitas de cortes de frangos congelados, armazenados em freezers de supermercados e hipermercados em três regiões do interior do Estado de São Paulo, São José do Rio Preto, Monte Alto e Jaboticabal, visando a pesquisa da presença de *Escherichia coli* e seus subgrupos diarreiogênicos, *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens*. Foram colhidos 20 pacotes comerciais que pesavam por volta de 1 kg, sendo estes de 15 marcas diferentes em 8 supermercados e hipermercados (Tabela 2). Os pacotes de cortes foram transportados em caixa térmica até o laboratório para a realização das análises após o descongelamento total em temperatura ambiente.

Tabela 2. Amostragens de cortes de frangos congelados realizadas em supermercados.

Amostra	Nº do Supermercado ¹	Localização do Supermercado	Marca	Tipo de corte
1	M1	Jaboticabal	A	Coxinhas das asas
2	M1	Jaboticabal	B	Coxas
3	M1	Jaboticabal	C	Frango a passarinho
4	M1	Jaboticabal	D	Coxinhas das asas
5	M2	S. J. Rio Preto	E	Sobrecoxas
6	M2	S. J. Rio Preto	F	Sobrecoxas
7	M2	S. J. Rio Preto	D	Coxas
8	M3	S. J. Rio Preto	G	Sobrecoxas
9	M3	S. J. Rio Preto	H	Sobrecoxas
10	M3	S. J. Rio Preto	I	Coxinhas das asas
11	M4	Jaboticabal	D	Asas
12	M4	Jaboticabal	J	Frango a passarinho
13	M4	Jaboticabal	C	Sobrecoxas
14	M4	Jaboticabal	A	Coxas
15	M5	Tanabi	K	Coxas e Sobrecoxas
16	M6	Tanabi	L	Tulipas
17	M6	Tanabi	M	Coxas e Sobrecoxas
18	M7	Pirangi	N	Tulipas
19	M8	S. J. Rio Preto	H	Frango a passarinho
20	M8	S. J. Rio Preto	O	Coxinhas das asas

¹M (Market) – Supermercados.

3.2. Análises microbiológicas

3.2.1. Contagem de colônias de *Clostridium* spp. de amostras de frigoríficos

A partir dos tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1% estéril com o suabe, foram feitas diluições seriadas até 10^{-2} . As diluições para a contagem de *Clostridium* spp. foram submetidas a choque térmico para eliminar possíveis contaminantes não esporulados e para induzir a germinação dos esporos (CASAGRANDE, et al. 2013).

Logo após, alíquotas de 1,0mL das diluições foram semeadas, em duplicata, em placas de Petri adicionando o ágar RCA⁸ pelo método *pour plate*. As placas foram incubadas em anaerobiose em jarras com sistema GasPak® a 37°C por 48 horas (APHA, 2001). Após a multiplicação bacteriana, foram realizados esfregaços corados

⁸ Reinforced Clostridial Agar (Merck).

pelo método de Gram de colônias características, amarelas claras e opacas, para confirmar a presença de bastonete Gram positivo esporulado e, logo após, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹). Os dados dessas contagens foram transformados em unidades formadoras de colônia por cm² (UFC.cm⁻²)⁹, conforme utilizado em normas internacionais.

3.2.2. Contagem de colônias de Enterobactérias de amostras de frigoríficos

A contagem de colônias de Enterobactérias totais foi realizada a partir de tubos contendo água peptonada 0,1% estéril com o suabe, foram feitas diluições seriadas até 10⁻³. Posteriormente, alíquotas de 1,0mL das diluições foram semeadas por *pour plate*, em duplicata, em placas de Petri adicionando o ágar MacConkey, específico para enterobactérias. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24h. Foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram de colônias características, cor rosa com precipitado bile, para confirmar a presença de bastonetes Gram negativos e, logo após, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹). Os dados dessas contagens foram transformados em unidades formadoras de colônia por cm² (UFC.cm⁻²)⁹, conforme utilizado em normas internacionais.

3.2.3. Análises estatísticas das contagens de colônias de *Clostridium* spp. e de Enterobactérias de amostras de frigoríficos

Os dados obtidos das contagens de *Clostridium* spp. e de Enterobactérias foram analisados estatisticamente pela análise de variância. As médias foram

⁹ Cálculo da conversão de UFC. mL⁻¹ em UFC. cm⁻² → $\text{UFC. cm}^{-2} = \frac{\text{UFC.mL}^{-1}}{2}$

agrupadas pelo delineamento inteiramente casualizado (DIC) e com um ensaio fatorial 6x4, por meio do teste F, ao nível de significância de 5%. Antes de proceder com as análises estatísticas, os resultados foram transformados em $\log \text{UFC.mL}^{-1}$. As análises de variância foram realizadas utilizando-se o pacote CAR (JOHN; SANFORD, 2011) e as médias foram estimadas pelo método dos mínimos quadrados por meio do pacote LSMEANS (LENTH, 2013).

Como o segundo frigorífico não possuía dois turnos de trabalho, tal estabelecimento foi eliminado das análises estatísticas devido à quantidade insuficiente de dados para compor a análise de variância.

3.2.4. Cultivo bacteriano para extração de DNA de amostras de frigoríficos

Os tubos de ensaio contendo caldo BHI e um dos suabes foram incubados a 37°C por 24 horas para promover o cultivo bacteriano total. Após a multiplicação bacteriana, uma alíquota foi armazenada em glicerol 20% em freezer -80°C e, outra alíquota, foi destinada à extração de DNA para identificação bacteriana por PCR.

3.2.5. Cultivo bacteriano a partir de amostras colhidas em granjas comerciais

Os suabes contendo amostras do conteúdo cloacal de frangos em granjas comerciais foram colocados em tubos de ensaio contendo 3,0mL de caldo BHI visando o cultivo bacteriano total. Antes de proceder a incubação dos tubos, os suabes foram esfregados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar XLD¹⁰, específico para Enterobactérias, e ágar TSC+SFP¹¹, enriquecido com gema de ovo, específico para *C. perfringens*. Após este procedimento, o suabe foi retornado ao tubo de ensaio

¹⁰ Xylose-Lysine-Desoxycholate (Merck)

¹¹ Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) + Shahadi Ferguson Perfringens (SFP) (Himedia)

contendo o caldo BHI, no qual foi acrescentado mais 2,0mL do caldo. Os tubos de ensaio e as placas de Petri foram então incubados a 37°C de 24 a 48 horas. Para o cultivo de *C. perfringens*, tal incubação foi realizada em jarras anaeróbicas com sistema GasPak®. Posteriormente, uma alíquota do cultivo bacteriano foi armazenada em glicerol 20% em freezer -80°C e, outra foi destinada à extração de DNA para identificação das bactérias por PCR.

3.2.6. Cultivo bacteriano a partir de amostras de cortes de frangos congelados

Após o descongelamento, os cortes de frangos foram retirados de sua embalagem original e colocados em sacos de autoclave estéreis, adicionando 400mL de água peptonada 0,1% estéril, e homogeneizados por 2 min, a fim de se realizar o enxague dos mesmos. Posteriormente, o volume de água peptonada do enxague foi dividido em dois frascos estéreis, sendo um utilizado para pré-enriquecimento para a multiplicação de *Salmonella* spp. e outro para pré-enriquecimento de *E. coli* e *C. perfringens*.

O frasco destinado ao cultivo de *Salmonella* spp., foi incubado a 42°C por 24h. Após o pré-enriquecimento, uma alíquota de 1,0mL foi transferida para um tubo contendo caldo Selenito e, outra alíquota de 0,1mL foi transferida para um tubo contendo caldo Rappaport-Vassiliadis, os quais foram incubados a 37°C e 42°C, respectivamente, por 24h. Em seguida, o conteúdo de uma alça de 10µL foi plaqueado por esgotamento em placas de Petri contendo ágar XLD, as quais foram incubadas a 37°C por 24h. Após o aparecimento de colônias características de *Salmonella* spp., com coloração preta, procedeu-se o isolamento das colônias, as quais foram repicadas para tubos contendo caldo BHI, cujo cultivo bacteriano foi realizado a 37°C

por 24h. Amostras do cultivo bacteriano foram aliquotadas para extração de DNA e armazenamento em glicerol 20% em freezer -80°C.

Já o frasco destinado às análises da presença de *E. coli* e *C. perfringens*, foi incubado a 37°C por 24h. Uma alíquota de tal cultivo bacteriano foi plaqueada por esgotamento em placas de Petri contendo ágar XLD, para o cultivo de *E. coli*, e em placas de Petri contendo Ágar TSC+SFP, para o cultivo de *C. perfringens*. As placas contendo ambos os meios de cultura foram incubadas em estufa a 37°C por 24h, sendo que aquelas destinadas à identificação de *C. perfringens* foram colocadas em jaras de anaerobiose. As colônias características de *E. coli* e *C. perfringens* foram repicadas para tubos contendo caldo BHI, os quais foram incubados a 37°C por 24h. Após, alíquotas do cultivo bacteriano foram separadas, também, para extração de DNA e armazenamento em glicerol 20% em freezer -80°C.

3.3. Análises moleculares

3.3.1. Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas inicialmente por lise térmica (OLSVIK; STROCKBINE,1993). Para tanto, 1,0mL do cultivo bacteriano foi transferido para microtubos de 2,0mL. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.400 x *g* em temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* de células foi acrescentado 1,0mL de solução PBS (8mM Na₂HPO₄.12H₂O; 1,76mM KH₂PO₄; 137mM NaCl; 2,7mM KCl). O *pellet* foi dissolvido em vórtex e, logo em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* de células foi acrescentado 0,3mL de água Milli-Q estéril, na qual o mesmo foi novamente ressuspensionado. A

extração de DNA foi realizada mantendo-se os tubos em equipamento Thermomixer Compact¹² com temperatura de 99°C, por 10 minutos. Após a lise térmica das células, as amostras foram submetidas à centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente para a separação das células do material genético. Assim, logo após, 0,2mL do sobrenadante, contendo o DNA, foram transferidos para tubos novos e armazenados em freezer.

A quantificação e a qualidade do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro Biophotometer Plus¹³. A relação da absorbância entre os comprimentos de onda de 260 e 280nm resulta no valor referente à qualidade do DNA, desejável entre 1,8 e 2,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.3.2. Detecção de *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. e subgrupos diarreiogênicos de *Escherichia coli* por PCR

Para identificação da presença de *C. perfringens* nas amostras, foi realizada a PCR para amplificação de um fragmento de 900 pb do gene *cpa* utilizando-se o par de *primers* CPA5L (5' – AGT CTA CGC TTG GGA TGG AA – 3') e CPA5R (5' – TTT CCT GGG TTG TCC ATT TC – 3'), desenvolvidos por Baums et al. (2004). Já para identificação da presença de *Salmonella* spp. utilizou-se o par de *primers* INVAF (5' – CGG TGG TTT TAA GCG TAC TCT T – 3') e INVAR (5' – CGA ATA TGC TCC ACA AGG TTA – 3') para amplificação de fragmento esperado de 796 pb do gene *invA* (FRATAMICO, 2003). A presença dos subgrupos diarreiogênicos de *E. coli*, STEC, foi detectada com presença dos genes *stx1* e *stx2* e, EPEC, com presença do gene *eae*,

¹² Eppendorf

¹³ Eppendorf

ETEC com a presença dos genes *eltB*, *estA* e *estB* e a EAEC com os genes *aatA* e *aggR* (Tabela 3).

Tabela 3. Sequências de *primers* específicos utilizados na diferenciação dos subgrupos de *E. coli*.

<i>Primers</i>	Sequências	Tamanho (pb)	Temperatura de Anelamento	Referências
<i>stx1</i>	AGAGCGATGTTACGGTTTG TTGCCCCCAGAGTGGATG	388	55°C	CHINA et al. (1996)
<i>stx2</i>	TGGGTTTTTCTTCGGTATC GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807		
<i>eae</i>	AGGCTTCGTCACAGTTG CCATCGTCACCAGAGGA	570		
<i>eltB</i>	TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC	275	57°C	FURRER et al. (1990)
<i>estA</i>	TCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG GCACAGGCAGGATTACAACAAAGT	163		NGELEKA et al. (2003)
<i>estB</i>	GCAATAAGGTTGAGGTGAT GCCTGCAGTGAGAAATGGAC	368		LORTIE et al. (1991)
<i>aggR</i>	CTAATTGTACAATCGATGTA AGAGTCCATCTCTTTGATAAG	457	55°C	CERNA et al. (2003)
<i>aatA</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	629		SCHMIDT et al. (1995)

Para a reação PCR de amplificação dos fragmentos, utilizou-se tampão 1X (200mM Tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl); MgCl₂ 2,0mM; dNTP's 0,2 M, 0,5U de Taq DNA polimerase, 5pmol de cada primer, 2μL de DNA genômico (aproximadamente 100ng.μL⁻¹) e água pura estéril q.s.p. 20μL. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti Thermal Cycler¹⁴ programado para realizar 1 ciclo a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 55°C para *E. coli* e *C. perfringens* e 60°C para *Salmonella* spp. por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, e para finalizar um ciclo a 72°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5μg.mL⁻¹) e padrão de tamanho

¹⁴ Applied Biosystems

molecular 1kb DNA Ladder Plus¹⁵. Os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR¹⁶.

3.3.3. Detecção de genes codificadores de toxinas de *Clostridium perfringens* por meio da PCR multiplex

O DNA das amostras positivas para o gene *cpa* foi submetido à PCR multiplex utilizando-se tampão 1X (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl; MgCl₂ 2,0mM; dNTP's 0,2mM, 1,5U de *Taq DNA polimerase*, 5 pmol de cada *primer* (Tabela 4), 60ng.µL⁻¹ de DNA genômico e água pura estéril para 20µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti Thermal Cycler⁶ programado para realizar 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minuto, e para finalizar, um ciclo a 72°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese e visualizados sob as mesmas condições descritas no item 3.3.2.

Tabela 4. Sequência de *primers* utilizados na tipagem do *Clostridium perfringens*, segundo Baums et al. (2004).

Genes	Toxinas	Tipos de <i>C. perfringens</i>	Sequência do primer (5'→ 3')	Tamanho (pb)
<i>cpa</i>	α	A, B, C, D, E	AGTCTACGCTTGGGATGGAA TTTCCTGGGTTGTCCATTTC	900
<i>cpb</i>	β	B, C	TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA	611
<i>etx</i>	ε	B, D	TGGGAACCTTCGATACAAGCA TTAACTCATCTCCCATAACTGCAC	396
<i>iap</i>	γ	E	AAACGCATTAAAGCTCACACC CTGCATAACCTGGAATGGCT	293
<i>cpe</i>	Cpe	A	GGGGAACCCTCAGTAGTTTCA ACCAGCTGGATTGAGTTTAATG	506

¹⁵ Invitrogen

¹⁶ BioRad

3.3.4. Isolamento de Bacteriano

As amostras positivas para *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* shigatoxigênica (STEC) e *C. perfringens* foram submetidas ao isolamento bacteriano, a fim de se obter colônias puras e isoladas. Tais procedimentos são de extrema importância para que seja obtido um resultado mais eficaz na análise do perfil genético dos isolados. Dentre as espécies bacterianas submetidas ao isolamento, somente a *E. coli* EPEC foi encontrada.

3.3.4.1. Isolamento de *C. perfringens*

As amostras positivas para o gene *cpa* foram submetidas ao isolamento bacteriano, o qual seguiu o protocolo preconizado para *E. coli* pelo *Reference Laboratory for Escherichia coli*, (EcL), da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal¹⁷, com modificações, conforme mostra a Figura 4. Entretanto, não foi obtida nenhuma cepa isolada para tal espécie.

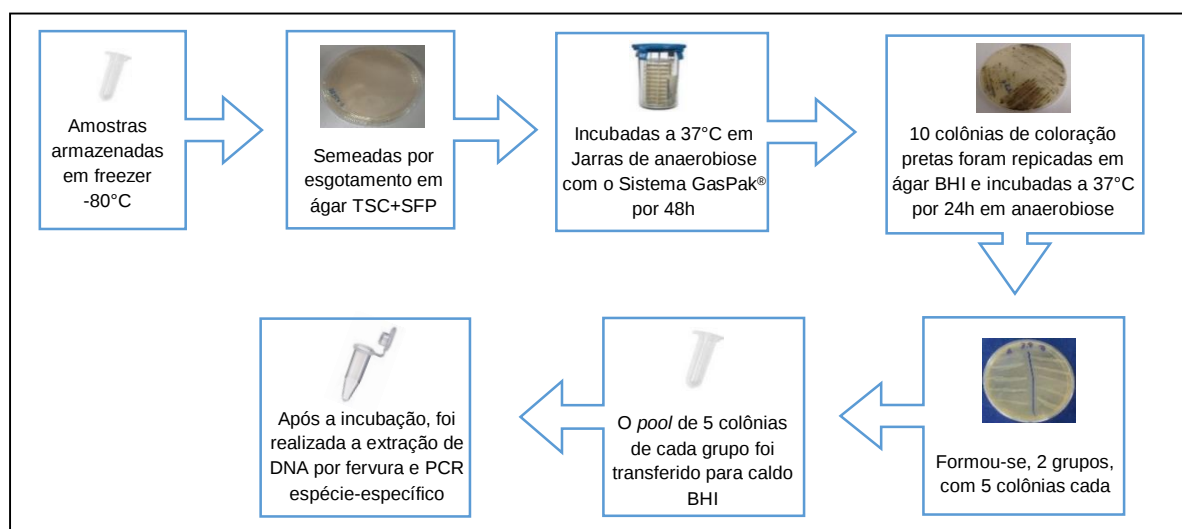


Figura 4. Isolamento de *Clostridium perfringens* a partir de amostras colhidas em granjas, frigoríficos e supermercados, segundo o protocolo preconizado para *E. coli* pelo *Reference Laboratory for Escherichia coli*, (EcL), da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal, com modificações.

¹⁷ disponível em http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx

3.3.4.2. Isolamento de *Escherichia coli*

As amostras que apresentaram amplificação para um ou mais genes de *E. coli* foram submetidas ao isolamento, haja visto que as cepas com genes de virulência encontravam-se em um *pool* de enterobactérias, conforme a Figura 5.

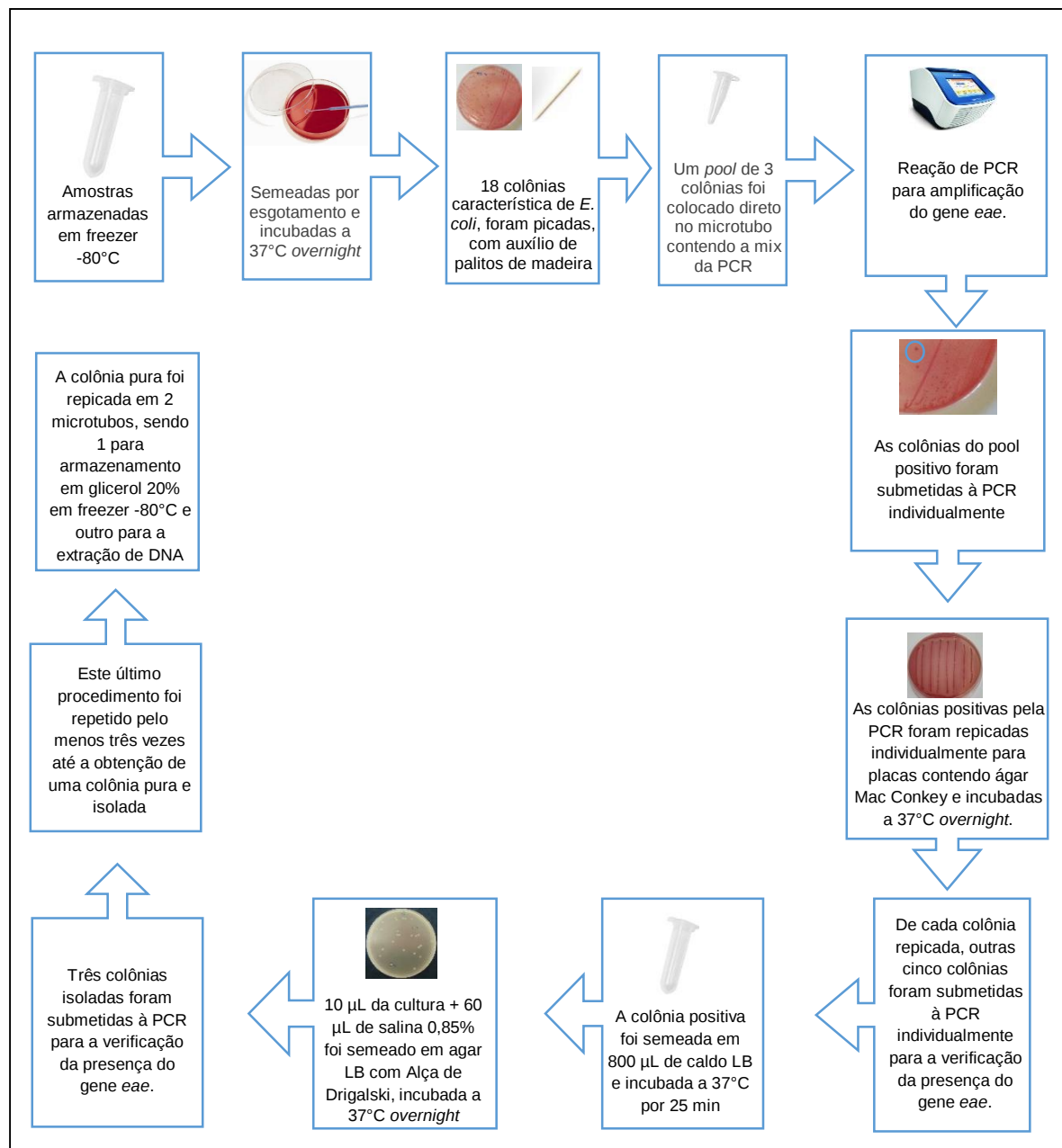


Figura 5. Isolamento de *Escherichia coli* diarreiogênicas a partir de amostras colhidas em granjas, frigoríficos e supermercados, segundo o protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Epidemiologia Molecular da FCAV/ UNESP Jaboticabal.

3.3.5. Extração de DNA dos isolados para análise de perfil genético

O protocolo para extração de DNA aplicado foi desenvolvido pelo Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV/UNESP. Para tanto, uma alíquota de 1,0mL do cultivo de cada cepa bacteriana purificada foi centrifugada por 5 minutos a $13.400 \times g$ para formação do *pellet* de células. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram acrescentados 700µL de tampão de extração (160mM Tris-HCl pH 8,0; 60mM EDTA pH 8,0, 20mM NaCl, SDS 0,5%). Os tubos foram agitados em vórtex e mantidos em banho-maria a 65°C por 40 minutos, sendo agitados a cada 15 minutos. Posteriormente, acrescentaram-se 300µL de acetato de potássio 5M à solução que foi invertida gentilmente. Os tubos foram mantidos no gelo por 30 minutos, sendo invertidos a cada 15 minutos. Após, acrescentou-se à solução 700µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados em vórtex e, em seguida, submetidos à centrifugação a $13.400 \times g$ por 10 minutos a 10°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos novos, aos quais foram acrescentados 1000µL de álcool etílico absoluto gelado. A solução foi homogeneizada e mantida em freezer -20°C *overnight*. Após a precipitação do DNA em etanol, as amostras foram centrifugadas a $13.400 \times g$ por 17 minutos a 10°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA foi lavado em 700µL de etanol 70% mediante centrifugação sob as mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos contendo o *pellet* de DNA foram colocados em estufa para secar. O *pellet* seco foi então ressuspendido em 30µL de TE (10mM Tris-HCl; 1,0mM EDTA; pH 8,0) e o DNA foi armazenado a -20°C.

A quantificação e a qualidade do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro Biophotometer Plus¹⁸. A relação da absorbância entre os comprimentos de onda de 260 e 280nm resulta no valor referente à qualidade do DNA, desejável entre 1,8 e 2,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.3.6. Análise do perfil genético bacteriano por Rep-PCR

A análise do perfil genético dos isolados bacterianos foi realizada mediante emprego da técnica Rep-PCR, utilizando-se os *primers* REP1R-I (5' III ICG ICG ICA TCI GGC 3') e REP2-I (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3') constituindo a Rep-PCR, ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'), ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') constituindo a ERIC-PCR, BOX A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') a BOX-PCR e GTG₅ (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') (VERSALOVIC et al., 1994).

Para a reação de amplificação dos fragmentos, foram utilizados tampão 1X (200mM Tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl), MgCl₂ 2,5mM, dNTP's 0,2mM, 1,0U de Taq DNA polimerase, 5pmol de primer, 40ng.µL⁻¹ de DNA genômico e água pura estéril q.s.p. 20µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti programado para realizar 1 ciclo a 95°C por 4 minutos, 36 ciclos a 94°C por 50 segundos, 50 segundos a 43°C para Rep-PCR e GTG, 53°C para ERIC-PCR e 50°C para BOX-PCR, seguido do ciclo a 72°C por 1,5 minuto. Para finalizar um ciclo a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5µg.mL⁻¹). O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR.

¹⁸ Eppendorf

O conjunto de bandas obtido pela amplificação com os *primers* REP, ERIC, BOX e GTG foi analisado manualmente, sendo a presença de banda representada pelo número um e a ausência por zero. Dessa forma, a matriz binária obtida foi convertida em uma matriz de distância a qual foi utilizada para gerar o agrupamento neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987), com bootstrap de 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985), utilizando-se o software PAUP¹⁹ Versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2002).

3.3.7. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Para o teste de sensibilidade de bactérias aos antimicrobianos, foram utilizados somente os isolados submetidos a técnica da análise do perfil genético. A análise utilizada foi descrita por Kirb-Bauer (BAUER; KIRB; SHERRIS, 1966). Para tanto, os isolados armazenados em freezer -80°C, foram pré-cultivados em 3,0mL de caldo BHI a 37°C *overnight*. Antes da semeadura para a colocação dos discos de antibióticos, as amostras foram padronizadas segundo o padrão de turbidez, em que a solução padrão foi a de 0,5 da escala de Mac Farland. Em seguida, as amostras foram semeadas em placas de Petri, contendo ágar Mueller-Hinton²⁰ e, assim, procedeu-se a colocação do kit de discos Gram-negativos de antibióticos²¹ contendo Ampicilina (AMP 10mcg), Amicacina (AMI 30mcg), Amoxicilina + Clavulanato (AMC 30mcg), Ceftazidima (CAZ 30mcg), Cefepime (CPM 30mcg), Cefoxitina (CFO 30mcg), Cefuroxima (CRX 30mcg), Ciprofloxacina (CIP 5,0mcg), Gentamicina (GEN 10mcg),

¹⁹ *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*

²⁰ Himedia

²¹ Cefar

Meropenem (MER 10mcg), Cefalotina (CFL 30mcg), Sulfazotrim (SUT 25mcg). As placas foram então incubadas a 37°C durante 24 horas.

A avaliação dos resultados foi realizada medindo-se o halo de inibição da multiplicação bacteriana. Mediante os resultados, os isolados foram classificados como sensíveis ou resistentes de acordo com o padrão estabelecido para cada antimicrobiano de acordo com o fabricante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises microbiológicas

4.1.1. Contagem de colônias de *Clostridium* spp. e de Enterobactérias de amostras de frigoríficos

Os resultados das contagens de *Clostridium* spp. apresentaram uma variação entre os frigoríficos visitados. Dentre os estabelecimentos amostrados, apenas na primeira colheita não houve multiplicação bacteriana em meio específico RCA. A maior contagem, de $6,79 \times 10^3$ UFC.cm⁻², foi encontrada antes da limpeza pré-operacional na terceira amostragem realizada no frigorífico 1 (Anexo A).

As contagens de enterobactérias também apresentaram uma variação entre os frigoríficos visitados e, coincidentemente ao primeiro resultado, a maior contagem, de $9,76 \times 10^3$ UFC.cm⁻², ocorreu antes da limpeza pré-operacional na terceira amostragem realizada no frigorífico 1. Não houve contagem bacteriana apenas na limpeza pré-operacional na segunda amostragem do frigorífico SH3 (Anexo A).

Pela média da contagem bacteriana de *Clostridium* spp. na limpeza pré-operacional, notou-se que houve uma diminuição das médias, após a realização da higienização nas esteiras, apenas na segunda amostragem do frigorífico SH1 e na primeira do frigorífico SH2, nas demais amostragens houve um aumento dessa média. Já na limpeza operacional, a diminuição da contagem bacteriana ocorreu após a realização da higienização apenas no frigorífico SH3.S1.

Para o caso das enterobactérias, as limpezas pré-operacional e operacional não resultaram em drástica diminuição da contagem de células, denotando que as

mesmas são insuficientes para higienização com vistas à eliminação deste grupo bacteriano.

Assim, nota-se a ineficiência dos processos de limpeza na maioria dos frigoríficos amostrados para ambos grupos bacterianos, podendo acarretar na contaminação dos cortes de frango. Dessa forma, mudanças nas medidas preventivas à contaminação ainda fazem-se necessárias.

Nas legislações que estão em vigor no Brasil, não há padrões de contagens de bactérias para amostragens realizadas em equipamentos e utensílios. Segundo Massaguer (2006), os padrões ideais considerados pelo *Foods and Drugs Administration* (FDA) e pela *American Public Health Association* (APHA), para os equipamentos, são de 2 UFC.cm⁻², já para os utensílios são menos de 100 UFC/utensílio. No presente estudo, foram encontrados contagens superiores que as recomendadas por estes órgãos, tanto para *Clostridium* spp. como para Enterobactérias, não atendendo assim as normas internacionais.

De acordo com os padrões europeus, a contagem de enterobactérias em esteiras de frigoríficos após a higienização pré-operacional não pode ser superior a 1 UFC.cm⁻², demonstrando que, no Brasil, precisa-se de mais cuidados ao realizar este procedimento, pois as contagens obtidas neste estudo foram superiores às exigidas pela união europeia (EC, 2010).

As análises estatísticas dos dados obtidos a partir da contagem de *Clostridium* spp. mostraram uma diferença estatística entre os frigoríficos visitados e entre os tipos de limpeza realizados nas esteiras ($p < 0,0001$). A interação frigorífico *versus* limpeza das esteiras diferiu estatisticamente, ao nível de significância de 5%, demonstrando que houve uma correlação entre estes dois fatores. A análise de variância apresentou

média geral de 1,132, desvio padrão igual a 0,675 e coeficiente de variação de 59,578%.

Já as análises estatísticas para a contagem de Enterobactérias mostraram diferenças estatisticamente significativas somente entre os frigoríficos visitados ($p < 0,0001$), não havendo diferença entre os tipos de limpeza das esteiras ($p = 0,4057$). A interação entre frigorífico e a limpeza das esteiras também foi estatisticamente diferente, ao nível de significância de 5%. A análise de variância apresentou média geral de 1,640, desvio padrão de 0,939 e coeficiente de variação de 57,229%.

Dentre os frigoríficos visitados, os resultados das médias estatísticas para a contagem de *Clostridium* spp. foram de 0,71 log UFC.mL⁻¹ para a primeira colheita do frigorífico SH1, 0,77 log UFC.mL⁻¹ para a segunda colheita e de 2,22 log UFC.mL⁻¹ para a terceira colheita no mesmo estabelecimento. No frigorífico SH3, essas médias foram de 0,95 log UFC.mL⁻¹ para a primeira colheita e de 0,88 log UFC.mL⁻¹ para a segunda. Sendo que somente a terceira colheita do frigorífico SH1 diferiu estatisticamente das demais. Já a análise das médias estatísticas de acordo com os tipos de limpezas realizadas nas esteiras, mostrou uma diferença significativa entre a limpeza pré-operacional e a operacional, porém não diferiram quanto ao momento em que a amostragem foi realizada, se antes ou após cada procedimento de limpeza. Antes da limpeza pré-operacional, a média de colônias foi de 0,83 log UFC.mL⁻¹ e após tal procedimento, passou a ser de 0,93 log UFC.mL⁻¹. Por outro lado, valores superiores foram observados nas contagens antes e após a limpeza operacional, cujas médias foram de 1,40 log UFC.mL⁻¹ e 1,26 log UFC.mL⁻¹, respectivamente (Tabela 5).

Para a contagem de Enterobactérias, as médias estatísticas para o frigorífico SH1 foram de 2,24 log UFC.mL⁻¹ para a primeira colheita, de 1,51 log UFC.mL⁻¹ para a segunda e de 0,93 log UFC.mL⁻¹ para a terceira colheita realizada. Já as médias do frigorífico SH3 foram de 2,92 log UFC.mL⁻¹ para a primeira colheita e de 0,83 log UFC.mL⁻¹ para a segunda. Somente as médias de contagem da terceira colheita do frigorífico SH1 e da segunda colheita do frigorífico SH3 foram estatisticamente semelhantes entre si, diferindo das demais. Em ambos os processos de limpeza das esteiras, as médias não diferiram entre si, sendo estas de 1,72 log UFC.mL⁻¹ nas colheitas efetuadas antes da limpeza pré-operacional e de 1,66 log UFC.mL⁻¹ após tal procedimento. As médias das colheitas realizadas antes e após a limpeza operacional foram de 1,55 log UFC.mL⁻¹ e de 1,82 log UFC.mL⁻¹, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Comparações das médias estatísticas de contagem de bactérias entre os frigoríficos e comparação entre os tipos de limpeza das esteiras em relação a todas amostragens realizadas.

Frigoríficos	<i>Clostridium</i> spp.	Enterobactérias
	Médias (log UFC.mL ⁻¹)	Médias (log UFC.mL ⁻¹)
SH1.S1	0,71 ^a	2,24 ^c
SH1.S2	0,77 ^a	1,51 ^b
SH1.S3	2,22 ^b	0,93 ^a
SH3.S1	0,95 ^a	2,92 ^d
SH3.S2	0,88 ^a	0,83 ^a
Teste F	51,177 (p<0,0001)	48,005 (p< 0,0001)
Limpeza das esteiras ¹	<i>Clostridium</i> spp.	Enterobactérias
	Médias (log UFC.mL ⁻¹)	Médias (log UFC.mL ⁻¹)
BPO	0,83 ^a	1,72 ^a
APO	0,93 ^a	1,66 ^a
BO	1,40 ^b	1,55 ^a
AO	1,26 ^b	1,82 ^a
Teste F	10,903 (p<0,0001)	0,9737 (p=0,4057) ^{NS}

¹ SH (Slaughterhouse) – Frigoríficos, S (Samples) – Amostragem, BPO (Before Preoperacional Cleaning) – Antes da limpeza pré-operacional, APO (After Preoperacional Cleaning) – Depois da limpeza pré-operacional, BO (Before operacional Cleaning) – Antes da limpeza operacional, AO (After Operacional Cleaning) – Depois da limpeza operacional. ^{a-b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (teste f, sendo $\alpha=5\%$).

A interação entre frigorífico e o tipo de limpeza realizada nas esteiras foi analisada estatisticamente tanto para *Clostridium* spp. como para Enterobactérias, a

fim de verificar se estes fatores eram independentes entre si. Estas interações apresentaram-se significantes ao nível de 5%, com $p < 0,0001$ para *Clostridium* spp. e $p = 0,009$ para Enterobactérias, ou seja, estes fatores foram dependentes entre si em ambos casos. Como houve significância entre ambas as interações, foram realizados desdobramentos estatísticos para melhor análise dos dados (Tabela 6).

Tabela 6. Comparações de médias dos desdobramentos estatísticos da contagem de *Clostridium* spp. e de Enterobactérias da interação significativa frigorífico versus limpeza das esteiras.

<i>Clostridium</i> spp.						
Limpeza das esteiras ¹	Frigoríficos (SH)					Teste F
	SH1.S1	SH1.S2	SH1.S3	SH3.S1	SH3.S2	
BPO	0,71 ^{Aa}	0,94 ^{Aa}	1,09 ^{Aa}	0,71 ^{Aa}	0,71 ^{Aa}	0,96 ($p=0,43$)
APO	0,71 ^{Aa}	0,71 ^{Aa}	1,01 ^{Aa}	1,18 ^{Aa}	1,07 ^{Aa}	1,37 ($p=0,24$)
BO	0,71 ^{Aa}	0,71 ^{Aa}	3,55 ^{Bb}	1,22 ^{Aa}	0,83 ^{Aa}	47,97 ($p < 0,0001$)*
AO	0,71 ^{Aa}	0,71 ^{Aa}	3,25 ^{Bb}	0,71 ^{Aa}	0,93 ^{Aa}	39,90 ($p < 0,0001$)*
Teste F	0,00 ($p=1,00$)	0,45 ($p=0,72$)	61,42 ($p < 0,0001$)*	2,31 ($p=0,08$)	0,71 ($p=0,55$)	
Enterobactérias						
Limpeza das esteiras ¹	Frigoríficos (SH)					Teste F
	SH1.S1	SH1.S2	SH1.S3	SH3.S1	SH3.S2	
BPO	2,56 ^{ABb}	1,54 ^{Aa}	0,71 ^{Aa}	3,08 ^{Ab}	0,71 ^{Aa}	17,77 ($p < 0,0001$)*
APO	1,90 ^{Ab}	1,48 ^{Aab}	0,97 ^{Aab}	3,23 ^{Ac}	0,71 ^{Aa}	14,96 ($p < 0,0001$)*
BO	1,60 ^{Aabc}	1,92 ^{Abc}	0,98 ^{Aab}	2,35 ^{Ac}	0,89 ^{Aa}	6,05 ($p=0,0001$)*
AO	2,90 ^{Bb}	1,10 ^{Aa}	1,06 ^{Aa}	3,00 ^{Ab}	1,01 ^{Aa}	16,12 ($p < 0,0001$)*
Teste F	4,89 ($p=0,003$)*	1,92 ($p=0,13$)	0,41 ($p=0,75$)	2,20 ($p=0,09$)	0,34 ($p=0,79$)	

*Interação significativa ao nível de 5%; ¹SH (Slaughterhouse) – Frigoríficos, S (Samples) – Amostragem, BPO (Before Preoperacional Cleaning) – Antes da limpeza pré-operacional, APO (After Preoperacional Cleaning) – Depois da limpeza pré-operacional, BO (Before operacional Cleaning) – Antes da limpeza operacional, AO (After Operacional Cleaning) – Depois da limpeza operacional. ^{AB;ab} Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na coluna e minúscula na linha) não diferem estatisticamente entre si (teste f, sendo $\alpha = 5\%$).

Na análise do desdobramento de *Clostridium* spp., notou-se que somente no frigorífico SH1.S3 houve diferença entre as médias da limpeza pré-operacional e operacional, porém não houve diferença quanto ao momento em que a colheita foi realizada. Apenas na limpeza operacional houve diferenças entre as médias de

contagem de *Clostridium* spp. nas amostragens realizadas antes e após a limpeza, sendo que as maiores médias foram encontradas neste mesmo frigorífico (Tabela 6).

Ao analisar o desdobramento de Enterobactérias, foi observado que houve uma maior variação das médias. Dentre os frigoríficos, apenas no SH1, amostragem 1, foram notadas diferenças entre as limpezas efetuadas, na qual a colheita realizada antes da limpeza pré-operacional não apresentou-se diferente das demais. A menor média de contagem de Enterobactérias foi encontrada nas amostragens realizadas previamente às limpezas operacionais e a maior foi referente às colheitas realizadas após este procedimento (Tabela 6).

Dentre as higienizações realizadas, houve diferença entre o tipo de processamento e o momento em que a amostragem foi efetuada. Nas colheitas antes da limpeza pré-operacional e após a limpeza operacional, os frigoríficos SH1.S1 e SH3.S1 apresentaram o mesmo comportamento em suas médias, as quais foram semelhantes entre si, porém diferentes das demais. Com relação à colheita realizada após a limpeza operacional, o frigorífico SH1.S1 apresentou a menor média de contagem de enterobactérias e o frigorífico SH3.S1 a maior. Na amostragem antes da limpeza operacional, o frigorífico SH3.S1 apresentou a maior média diferindo das demais. Já o frigorífico SH3.S2 apresentou a menor média e a do frigorífico SH1.S1 foi estatisticamente semelhante às outras (Tabela 6).

Ao avaliar o desdobramento estatístico de *Clostridium* spp., para todas as amostras colhidas no S1, notou-se diferença estatística entre as limpezas somente na terceira amostragem sendo suas médias superiores às demais, mais precisamente na limpeza operacional. Já nas amostragens no S3, todas as limpezas realizadas apresentaram similaridade estatística.

No desdobramento para Enterobactérias, as amostragens realizadas no frigorífico SH1, na segunda amostragem após a limpeza operacional e antes da limpeza pré-operacional apresentaram-se estatisticamente semelhantes entre si, diferindo dos demais. Para as colheitas realizadas no frigorífico SH3, houve uma maior diferença estatísticas entre a primeira e segunda colheitas, sendo que na segunda colheita não houve diferenciação dos tipos de higienização.

Em estudo desenvolvido por Soares et al. (2014), que teve por objetivo avaliar a contagem de enterobactérias e de mesófilos totais em esteiras condutoras de cortes de frango no Brasil, submetidas ou não ao sistema de limpeza com água a 45°C sob pressão em diversos tempos, obtiveram resultados similares estatisticamente entre a contagem de populações de microrganismos independentemente do tempo avaliado. No presente estudo foi encontrada diferenças estatísticas entre a limpeza pré-operacional e operacional na contagem de *Clostridium* spp., e para a contagem de Enterobactérias os resultados foram similares aos de tais pesquisadores.

Em muitos países em desenvolvimento, a higienização nos frigoríficos não é adequada, resultando em contaminação bacteriana nos produtos de origem animal e, conseqüentemente, tornando-os fontes de transmissão de patógenos, tais como a *E. coli* O157:H7, dentre outros. Portanto é de suma importância que a higiene adequada seja implementada desde as granjas, frigoríficos, até a comercialização desses produtos destinados ao consumo humano para que se possa limitar tal transmissão (ATEBA; MBEWE 2014; FEGAN et al., 2004). Assim quanto menor for a contagem bacteriana nas esteiras, tanto de *Clostridium* spp. como de Enterobactérias, menor será a chance de transmissão de patógenos para as carcaças de frangos, já que estas

passam por estas esteiras antes de serem embaladas e comercializadas em supermercados.

4.2. Análises moleculares

4.2.1. Detecção de *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. e subgrupos diarreiogênicos de *Escherichia coli* por PCR

4.2.1.1. Amostragens realizadas em frigoríficos

Durante todo o experimento, não foi diagnosticada nenhuma amostra para *Salmonella* spp. (Figura 6 A). Foram identificadas somente 23 amostras positivas para *E. coli* subgrupo EPEC na terceira amostragem realizada no frigorífico 1 (Figura 6 B) e uma amostra foi identificada como *C. perfringens*, sorotipo A, na primeira amostragem realizada no frigorífico 1 (Figura 7).

De acordo com Rodrigues et al. (2013), que verificaram a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em diferentes superfícies na sala de cortes de frango em frigoríficos, encontraram apenas *Listeria monocytogenes* e *Listeria welshimerii*. Os autores relataram que a temperatura fria e a alta umidade da sala podem ter dificultado o isolamento de *Salmonella* spp. nessas superfícies. Outro ponto observado foi que após a desinfecção, com detergente e amônio quaternário, não foi possível isolar nenhum microrganismo, indicando a eficácia dessa higienização. No presente estudo, também não foi diagnosticado a presença *Salmonella* spp. em esteiras condutoras de cortes de frangos.

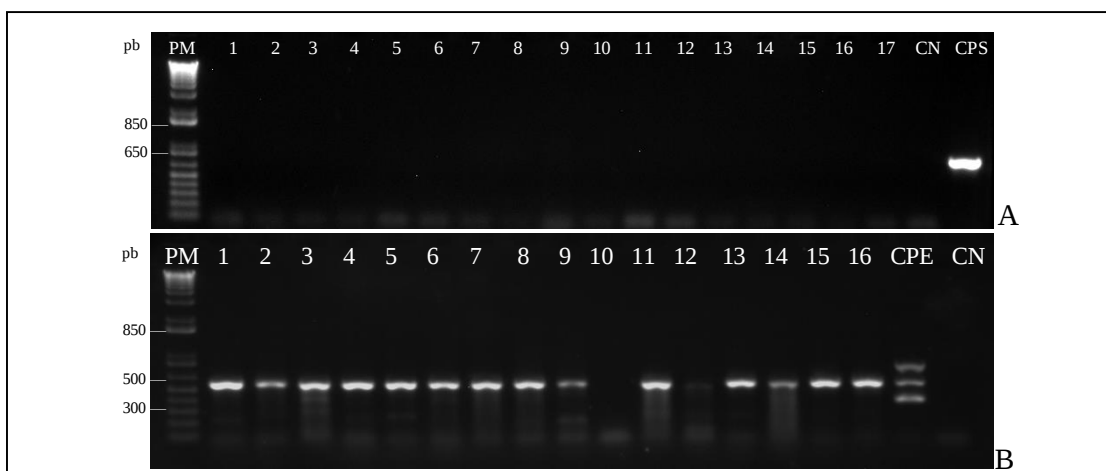


Figura 6. (A) PCR de amplificação para o gene *invA* de *Salmonella* spp. de 796 pb. Não houve amostras positivas. CPS: cepa padrão de *Salmonella* Typhimurium; (B) Produtos de PCR da amplificação dos genes *stx1*, *stx2* (STEC) e *eae* (EPEC) de *Escherichia coli*, de 388pb, 807pb e 570pb, respectivamente. Foram identificadas amostras positivas apenas para o gene *eae*. CPE: cepa padrão de *Escherichia coli*. PM: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). CN: controle negativo (mix sem DNA).

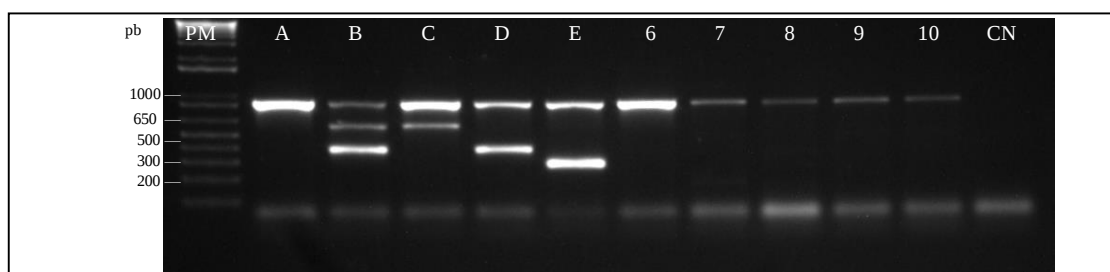


Figura 7. Produtos da PCR multiplex para identificação dos tipos de *Clostridium perfringens*, A, B, C, D e E, apresentando amplificação para os genes *cpa*, *cpb*, *cpe*, *etx* e *iap*, de 900 pb, 611pb, 506 pb, 396 pb e 293 pb, respectivamente. Linha 6: amostra positiva de frigorífico. Linhas 7-10: amostras positivas de cortes de frangos. PM: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). CN: controle negativo (mix sem DNA).

Em um estudo desenvolvido por Soares (2014), diagnosticou-se a presença em 49,06% das amostras avaliadas de várias espécies do gênero *Listeria*, *L. innocua*, *L. monocytogenes* e *L. welshimeri*, em superfícies de esteiras utilizadas em frigoríficos

de aves. Thévenot et al. (2005) também conseguiram isolar *Listeria monocytogenes* em superfícies de frigoríficos. Estes dois estudos são indicadores de que é possível encontrar bactérias patogênicas em superfícies que entram em contato com a carne, similarmente, como ocorreu em nosso estudo, no qual foi possível identificar *E. coli* enteropatogênica e *C. perfringens*.

Segundo Veluz, Pitchiah e Alvarado (2012), o material das esteiras utilizadas em frigoríficos de aves podem influenciar no grau de adesão bacteriana, sendo demonstrado em tal estudo que o aço inoxidável possui uma aderência mais fraca para as bactérias quando comparado aos plásticos, podendo ser considerado um material melhor para minimizar a contaminação cruzada. Os patógenos, *E. coli* e *C. perfringens*, encontrados neste trabalho estavam em esteiras de plástico poliuretano do tipo lisas.

4.2.1.2. Amostragens realizadas em granjas de frangos de corte

Das 60 amostras colhidas em uma granja comercial na região de Jaboticabal, 32 amostras apresentaram positividade para o gene *eae* de *E. coli*, enquanto das 104 amostras colhidas na região de Monte Alto/SP, 75 foram positivas para o mesmo gene. Novamente, não foram encontradas amostras positivas para *C. perfringens* e *Salmonella* spp..

Nenhuma amostra de *Salmonella* spp. foi diagnosticada por Ravagnani et al. (2012), que avaliou a contaminação por *Salmonella* spp. em frangos de corte criados em galpões climatizados na região oeste do Paraná. Já em outro estudo, Svobodová, Steinhäuserová e Nebola (2007) encontraram a presença de *C. perfringens* em frangos. Porém no presente trabalho, foi diagnosticada apenas a presença de EPEC.

A presença de bactérias, tais como a *Salmonella* spp., *E. coli* e *C. perfringens*, é comumente relatada em criação de aves de corte e estas geram grande perdas econômicas tanto para os produtores como para o setor agrícola (ANDREATTI FILHO et al., 2009). Dessa forma, ressalta-se a importância de cuidados durante a etapa de criação dos animais, para que os prejuízos sejam minimizados além de evitar que estes patógenos sejam possivelmente transmitidos por meio da cadeia produtiva de frangos de corte.

4.2.1.3. Amostragens de cortes de frangos congelados

Das 20 amostras colhidas, foram encontradas quatro amostras positivas para *E. coli* do subgrupo EPEC portadoras do gene *eae*, e duas para o subgrupo STEC portadoras do gene *stx1*. Outras quatro amostras amplificaram para o gene *cpa* característico da espécie *C. perfringens*, pertencente ao sorotipo A (Figura 7). Nenhuma amostra foi positiva para *Salmonella* spp. (Tabela 7). Segundo RDC nº12/ANVISA (BRASIL, 2001), a qual estabelece padrões para o controle microbiológico de alimentos, não existem normas para a presença dos microrganismos em estudo nas carcaças. Tal resolução estabelece apenas padrões para a contagem de coliformes.

Em um estudo desenvolvido por RASSCHAERT et al. (2008), no qual pesquisou-se a contaminação por *Salmonella* das carcaças durante o abate de frangos, concluiu-se que é possível ocorrer uma contaminação cruzada do equipamento para a carcaças dos frangos.

Em nosso estudo, a presença de *E. coli* foi verificada em 30% das amostras colhidas em supermercados. Assim como verificado em um estudo realizado por

Magwedere et al. (2013), cujo objetivo foi avaliar a presença de *E. coli* em carne de varejo de diversas espécies animais, incluindo a carne de frango, sendo verificada a presença de *E. coli* diarreiogênicas em 75% das amostras avaliadas de cortes de frango congelados.

Clostridium perfringens do sorotipo A é comumente encontrado em animais, principalmente em aves, sendo este causador de doenças tanto em animais e como nos seres humanos (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2009; LINDSTRÖM et al., 2011). Em um estudo, realizado na Turquia, foi encontrado *C. perfringens* do sorotipo A em carnes bovina, de frango e de peru (ARAS; HADIMLI, 2015). Isso é indicativo de que tal espécie bacteriana pode ser encontrada em carnes de frango, confirmando os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 7. Identificação das amostras positivas de cortes congelados de frangos quanto à espécie bacteriana, estabelecimento, localidade e marca.

Amostras Positivas ¹	Espécie Bacteriana ²	Localização do Supermercado	Marca
M1.1	EPEC	Jaboticabal	A
M2.5	<i>C. perfringens</i>	S. J. Rio Preto	E
M3.8	EPEC	S. J. Rio Preto	G
M3.10	STEC	S. J. Rio Preto	I
M4.13	<i>C. perfringens</i>	Jaboticabal	C
M5.15	EPEC	Tanabi	K
M6.16	EPEC	Tanabi	L
M6.17	<i>C. perfringens</i>	Tanabi	M
M7.18	<i>C. perfringens</i>	Pirangi	N
M8.19	STEC	S. J. Rio Preto	H

¹M (Market) – Supermercados. ²EPEC- *E. coli* enteropatogênica; STEC - *E. coli* shigatoxigênica.

O fato de nenhuma amostra ter apresentado positividade para *Salmonella* pode ser explicado de acordo com um estudo realizado por Von Rückert et al. (2009) cujo objetivo foi avaliar a presença de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos, colhidas em cinco diferentes pontos do abate, depenagem, chuveiro de higienização,

evisceração manual, lavagem final e pré-resfriamento. Tais pesquisadores concluíram que no ponto de pré-resfriamento ocorre o controle de *Salmonella* spp. devido à baixas temperaturas e alta concentração de cloro aos quais as carcaças são expostas.

As contaminações bacterianas das carcaças de frango podem ocorrer durante o processo de abate, evisceração, depenagem e na manipulação das mesmas, já que as bactérias presentes nas penas, pele e trato digestivo podem ser transmitidas para as carcaças (MEAD, 1989). Porém se houver o devido manejo e higiene durante tais processos, essa transmissão pode ser minimizada.

4.2.2. Isolamento de *Escherichia coli*

No total de 136 amostras positivas para *E. coli* do subgrupo EPEC e STEC, encontradas nos três pontos da cadeia produtiva de frango, foram isoladas e purificadas 72 colônias de EPEC de 20 amostras, dentre os quais foram selecionados somente 27 isolados que apresentaram perfis genéticos diferentes para aplicação do Rep-PCR (Tabela 8). Para essa seleção, foi realizada, previamente, uma triagem das colônias purificadas, sendo estas expostas a dois marcadores moleculares o Rep-PCR e o Box-PCR.

Os isolados foram nomeados de acordo com a sua procedência, granja (PF), frigorífico (SH) e supermercado (M), seguido pelo número referente ao estabelecimento, número da amostragem, no caso dos frigoríficos somente, número da amostra e repetição, respectivamente, separados por um ponto (Tabela 8).

Tabela 8. Descrição da nomenclatura dos isolados bacterianos positivos para o gene *eae* de *E. coli*, quanto a localidade e o estabelecimento amostrado.

Isolados*	Estabelecimento	Localidade
PF1.2	Granja	Jaboticabal/SP
PF1.7	Granja	Jaboticabal/SP
PF1.21	Granja	Jaboticabal/SP
PF1.36.1	Granja	Jaboticabal/SP
PF1.36.2	Granja	Jaboticabal/SP
PF1.39	Granja	Jaboticabal/SP
PF1.47	Granja	Jaboticabal/SP
PF1.53	Granja	Jaboticabal/SP
PF1.56.1	Granja	Jaboticabal/SP
PF1.56.2	Granja	Jaboticabal/SP
PF2.7.1	Granja	Monte Alto/SP
PF2.7.2	Granja	Monte Alto/SP
PF2.42	Granja	Monte Alto/SP
PF2.72	Granja	Monte Alto/SP
PF2.76	Granja	Monte Alto/SP
PF2.79.1	Granja	Monte Alto/SP
PF2.79.2	Granja	Monte Alto/SP
PF2.79.3	Granja	Monte Alto/SP
PF2.91.1	Granja	Monte Alto/SP
PF2.91.2	Granja	Monte Alto/SP
PF2.91.3	Granja	Monte Alto/SP
SH1.S3.AO.47	Frigorífico	Passos/MG
SH1.S3.AO.57	Frigorífico	Passos/MG
SH1.S3.AO.60.1	Frigorífico	Passos/MG
SH1.S3.AO.60.2	Frigorífico	Passos/MG
M3.8	Supermercado	S.J. do Rio Preto/SP
M6.16	Supermercado	Tanabi/SP

*PF (Poultry Farm) – Granjas, SH (Slaughterhouse) – Frigoríficos, M (Market) – Supermercados.

4.2.3. Análise do perfil genético bacteriano por Rep-PCR

Foram selecionados 27 isolados de EPEC, oriundos de frigoríficos, granjas e supermercados (Tabela 8). Ressalta-se o difícil acesso a colônias isoladas genotípicas já que estas encontravam-se em meio a um *pool* de bactérias negativas para o gene específico de EPEC. Todos os isolados foram submetidos a técnica de Rep-PCR para avaliação do seu perfil genético. Para tanto foram utilizados os dados analisados dos marcadores REP1R/REP2 (Figura 8), ERIC1R/ERIC2 (Figura 9), BOXA1R (Figura 10) e GTG₅ (Figura 11) para gerar o dendrograma (Figura 12).

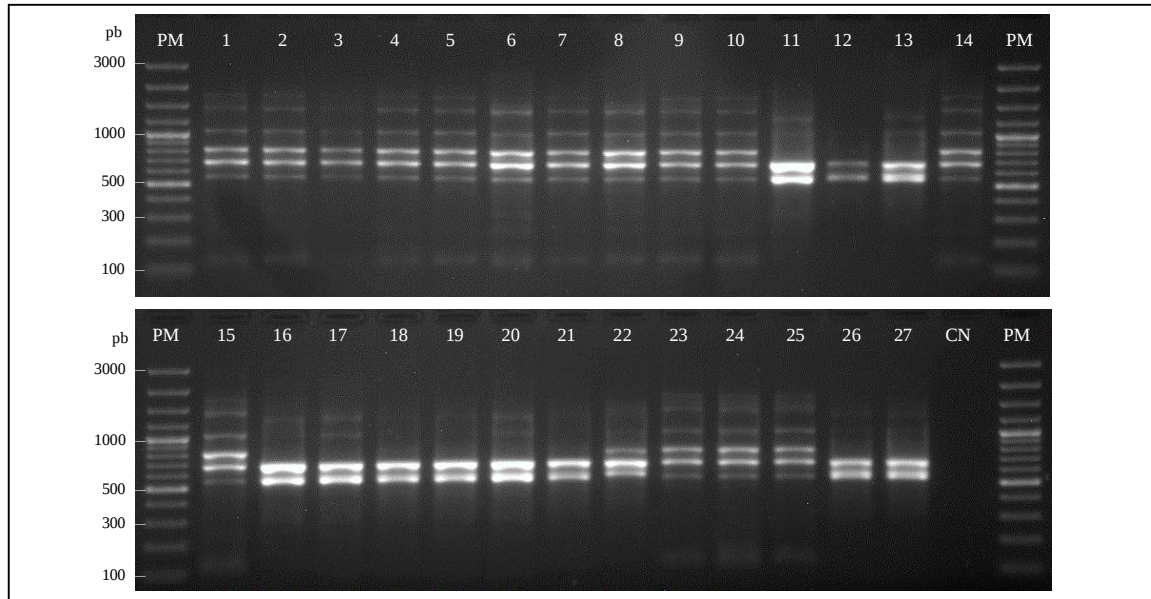


Figura 8. Produto de amplificação utilizando-se os *primers* REP1R/REP2 de isolados de *E. coli* obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

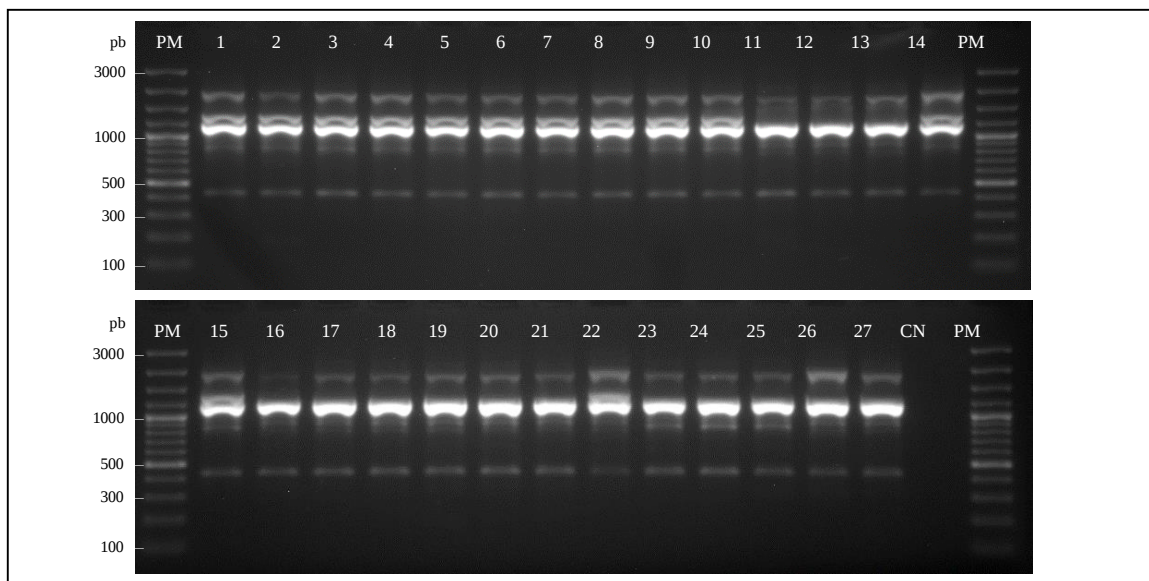


Figura 9. Produto de amplificação utilizando-se os *primers* ERIC1R/ERIC2 de isolados de *E. coli* obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

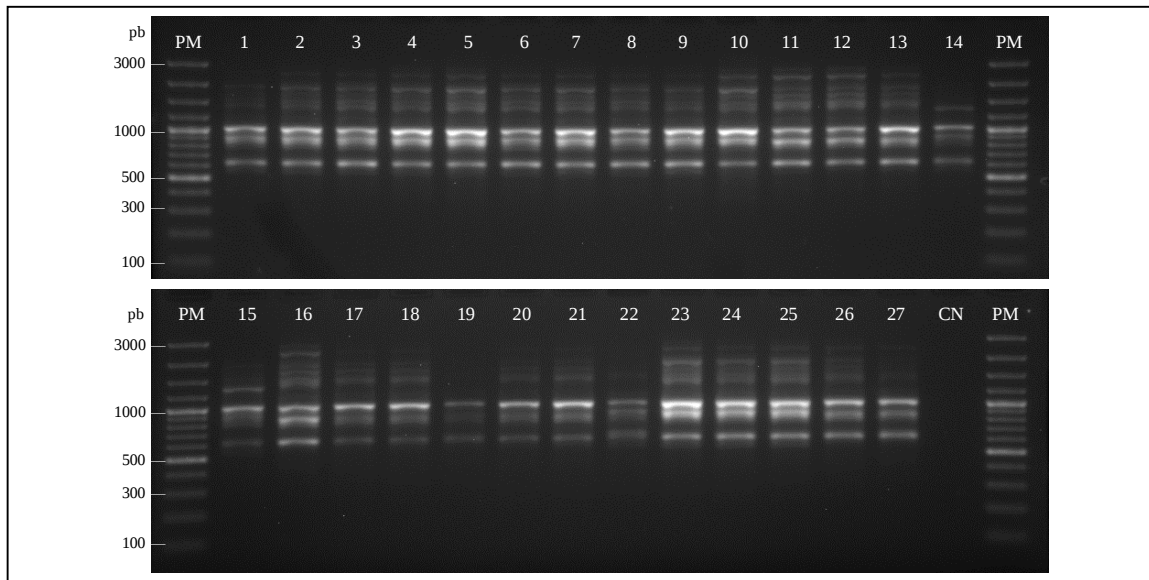


Figura 10. Produto de amplificação utilizando-se os *primers* BOXA1R de isolados de *E. coli* obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

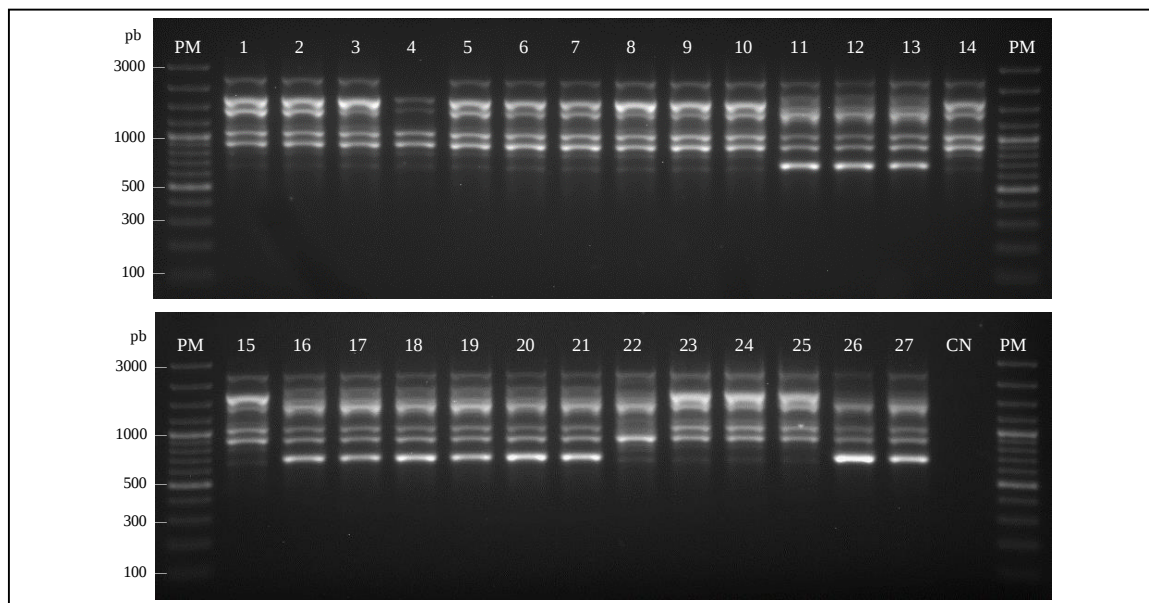


Figura 11. Produto de amplificação utilizando-se os *primers* GTG₅ de isolados de *E. coli* obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

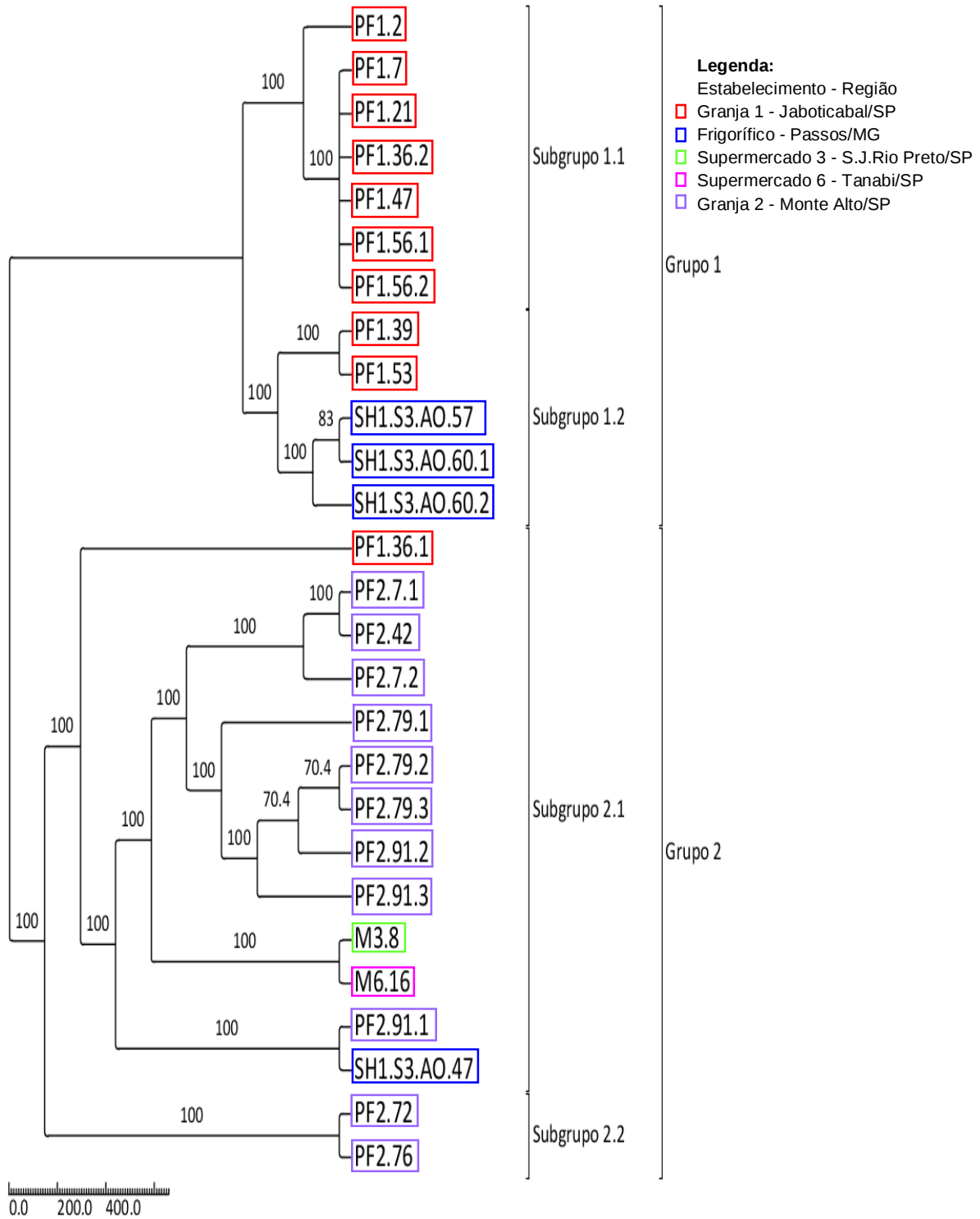


Figura 12. Agrupamento Neighbor-Joining resultante da análise dos marcadores moleculares REP, ERIC, BOX e GTG₅ de isolados de *E. coli* do subgrupo EPEC, oriundos de frigoríficos, granjas e supermercados.

Pela análise do dendrograma (Figura 12), observou-se que os isolados foram agrupados em dois grupos, sendo o Grupo 1 composto pela maioria dos isolados oriundos do frigorífico da região de Passos (SH1) e da granja comercial da região de Jaboticabal (PF1), enquanto o Grupo 2 foi formado por isolados da granja de Monte Alto e de supermercado e um do frigorífico. No Grupo 1, os isolados foram subdivididos em dois subgrupos. O Subgrupo 1.1 foi composto por isolados obtidos da granja da região de Jaboticabal (PF1), que mostraram baixa diversidade genética entre si. Já o subgrupo 1.2 foi formado por isolados da granja (PF1) e por isolados do frigorífico (SH1) que, embora tenham apresentado relação genética entre si, foram nitidamente separados em ramos diferentes, indicativo de que houve uma diferenciação genética desses isolados no ambiente dos quais provieram.

O Grupo 2 também foi subdividido em dois subgrupos, no entanto, apresentou uma diversidade genética entre isolados significativamente maior do que a observada no Grupo 1. Todos os isolados provenientes da granja da região de Monte Alto (PF2) encontraram-se no Grupo 2, sendo que a maioria se agrupou em um ramo específico no subgrupo 2.1 e apenas dois isolados compuseram o subgrupo 2.2, apresentando, assim, alta distância em relação aos demais isolados dessa procedência. Apenas um isolado da granja PF1 (PF1.36.1) alocou-se no Grupo 2, porém sem apresentar estreita relação genética com os isolados deste grupo.

Ainda no Grupo 2, observou-se que os isolados de cortes de frangos de supermercados apresentaram alta relação genética entre si, sendo estes de localidades próximas, São José do Rio Preto (M3.8) e Tanabi (M6.16). Embora sejam de marcas diferentes, tais cortes de frango, possivelmente, são oriundos de um ponto

em comum da cadeia produtiva. Também foi observada estreita relação genética entre um isolado obtido da granja, PF2.91.1 e um isolado do frigorífico SH1. Embora a granja esteja localizada na região de Jaboticabal e o frigorífico na região de Passos, certamente houve alguma relação entre estes dois pontos de amostragem, o que denota a possibilidade de contaminação cruzada entre os pontos da cadeia produtiva e a introdução de cepas de diferentes localidades no frigorífico. Quanto maior a diversidade genética bacteriana, maior é a dificuldade de controle e extinção do patógeno de um determinado local.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram relatados em um estudo de diversidade genética aplicando-se a Rep-PCR em 95 isolados de *E. coli* obtidos de amostras de conteúdo cloacal de frangos sintomáticos, em 23 fazendas no Irã (SOLTANI et al., 2012). Os pesquisadores relataram que, em sua maioria, isolados de mesmo perfil genético pertenciam à mesma propriedade, enquanto alguns isolados de diferentes fazendas possuíam perfis genéticos similares. Em outro estudo realizado por Wan et al. (2011), isolados de *E. coli* oriundos de suínos foram agrupados de acordo com a sua procedência pela aplicação da Rep-PCR.

De fato, conforme demonstrado neste trabalho e por outros na literatura, os marcadores GTG5, BOX, Rep-PCR e ERIC-PCR são considerados eficientes no estudo de caracterização clonal de *Enterobacteriaceae*, pois auxiliam na separação dos isolados por fonte de contaminação (MOHAPATRA et al., 2007). Tais resultados podem inclusive ser obtidos especialmente pela utilização do marcador ERIC em isolados de *E. coli* O157:H7 (ATEBA; MBEWE, 2014).

Há vários relatos sobre a acurácia da técnica Rep-PCR na diferenciação de isolados bacterianos. Segundo Albufera et al. (2009), esta técnica foi mais eficiente

em diferenciar isolados de *Salmonella* spp. em comparação com marcadores RAPD, além disso, os pesquisadores salientaram vantagens na utilização da Rep-PCR, como rápida execução e precisão na tipagem genética de estirpes bacterianas. Outro estudo, por sua vez, ao comparar algumas técnicas moleculares de alto padrão discriminatório, como o PFGE, Rep-PCR, MLST e perfil plasmidial, visando a identificação e tipagem de cepas de *Salmonella* Typhimurium, obtidas de alimentos de origem animal nos EUA, demonstrou a eficiência da Rep-PCR e o seu grande potencial na discriminação de estirpes bacterianas (FOLEY et al., 2006). Tais relatos concordam com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que a técnica aplicada mostrou-se eficiente em gerar perfis genéticos distintos entre os isolados de EPEC, que possibilitaram a separação dos mesmos, em sua maioria, por procedência e a proposição das suas relações genéticas.

4.2.4. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Os 27 isolados de *E. coli* EPEC analisados pela Rep-PCR, foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos. O resultado deste teste demonstrou que todos os isolados apresentaram resistência para pelo menos um antibiótico, e dentre estes, 23 (85,2%) foram resistentes a mais de quatro antibióticos.

Os antibióticos resultaram em um maior nível de resistência foram a Cefalotina (CFL), a Gentamicina (GEN), o Sulfazotrim (SUT), a Ampicilina (AMP) e a Ciprofloxacina (CIP), cujas porcentagens de isolados resistentes foram de 92,6%, 92,6%, 81,5%, 63% e 51,9%, respectivamente (Tabela 9).

Todos os isolados mostraram-se sensíveis ao antibiótico Meropenem (MER). Já os demais antibióticos resultaram em alta taxa de sensibilidade dos isolados, sendo

95,3% sensíveis à Ceftazidima (CAZ), 92,6% à Cefoxitina (CFO) e Cefepime (CPM), 74,1% à Amoxicilina + Clavulanato (AMC), 66,7% à Amicacina (AMI) e 55,6% à Cefuroxima (CRX), conforme a Tabela 9.

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um assunto amplamente abordado, já que este problema pode acarretar danos à saúde humana e animal. Um estudo que objetivou isolar *E. coli* co-resistente a Cefotaxima e Ciprofloxacina de carne de frango e de suíno na China, reportou a presença de cepas de *E. coli* co-resistente em 80 amostras (37,4%) de carne de frango em seu país (XU et al., 2014). A resistência de *E. coli* EPEC a diversos antibióticos também foi observada em seres humanos, cujas taxas foram de 95% para o Ácido Nalidíxico, 90% para a Amoxicilina, 77,5% para a Cefotaxima, 77,5% para a Norfloxacin, 75% para a Ceftriaxona, 72,5% para a Ciprofloxacina e de 70% para a Ofloxacina (RAJESHWARI et al., 2015).

Isolados de *E. coli* 0157:H7 obtidos a partir de carne bovina e de frango na Nigéria, submetidos a testes de sensibilidade a antimicrobianos mostraram-se resistentes a um ou mais antibióticos (OLATOYE et al., 2012). Os pesquisadores encontraram isolados mais resistentes na carne de frango à tetraciclina (89,7%), porém, também identificaram isolados resistentes à Cefuroxima (60,3%), Ampicilina (27,6%), Sulfazotrim (27,6%), Gentamicina (25,9%) e Ciprofloxacina (17,2%), o que concorda com os resultados encontrados no presente estudo.

Não foi encontrada relação entre a resistência dos isolados do presente estudo a antimicrobianos e o seu agrupamento no dendrograma. Apenas os isolados PF2.91.1, PF2.91.2 e PF2.91.3 apresentaram resistência aos mesmos antimicrobianos Cefalotina, Sulfazotrim, Gentamicina e Ampicilina. Dentre esses isolados, apenas PF2.91.2 e PF2.91.3 apresentaram perfis genéticos similares, sendo

agrupados no mesmo ramo no dendrograma, já o PF2.91.1 se encontra em um ramo diferente demonstrando que possui uma pequena distância genética dos demais.

Tabela 9. Resistência antimicrobiana dos isolados de *E. coli* enteropatogênica.

Antimicrobianos	Nº de isolados resistentes (%)
Cefalotina (CFL)	25 (92,6%)
Gentamicina (GEN)	25 (92,6%)
Sulfazotrim (SUT)	22 (81,5%)
Ampicilina (AMP)	17 (63,0%)
Ciprofloxacina (CIP)	14 (51,9%)
Cefuroxima (CRX)	12 (44,4%)
Amicacina (AMI)	9 (33,3%)
Amoxicilina + Clavulanato (AMC)	7 (25,9%)
Cefotixina (CFO)	2 (7,4%)
Cefepime (COM)	2 (7,4%)
Ceftazidima (CAZ)	1 (3,7%)
Meropenem (MER)	0

5. CONCLUSÃO

Os mecanismos de higienização foram insuficientes nas esteiras da maioria dos frigoríficos amostrados, já que as contagens de colônias de *Clostridium* spp. e de Enterobactérias foram superiores aos valores recomendado pelos órgãos internacionais.

Os patógenos estão disseminados nos três pontos analisados da cadeia produtiva de carne de frango, pois foi possível encontrar *Escherichia coli* enteropatogênica, *Escherichia coli* shigatoxigênica e *Clostridium perfringens* em granjas, esteiras condutoras de cortes em frigoríficos e em cortes de frangos congelados comercializados em supermercados.

A análise molecular por Rep-PCR mostrou maior relação genética entre isolados obtidos de uma mesma procedência. No entanto, também mostrou estreita relação genética entre isolados obtidos dos diferentes pontos da cadeia produtiva amostrados, o que é indicativo de que a contaminação cruzada pode ocorrer, desde a granja até o produto final nos supermercados.

Não houve relação entre a análise de diversidade genética e a sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos. A resistência antimicrobiana está presente entre as cepas de *E. coli* enteropatogênica isoladas neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2015**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2015>> Acessado em 02 novembro. 2015.

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Produção sustentável garante ao Brasil liderança nas exportações**. Revista Avicultura Brasil, n.1, p.4-7, 2012. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/938d713b69d9f25901b1d810f038272b.pdf>> Acessado em 08 fevereiro. 2016.

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/noticia/artigos/todas/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>> Acessado em 08 fevereiro. 2016.

ALBUFERA, U.; BHUGALOO-VIAL, P.; ISSACK, M. I.; JAUFEEERALLY-FAKIM Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by Rep-PCR and RAPD analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.322–327, 2009.

ANDERSON, D.B.; MCCracken, V. J.; AMINOV, R. I.; SIMPSON, J. M.; MACKIE, R. I.; VERSTEGEN, M. W. A.; GASKINS, H. R. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. **Pig News and Information**, v.20, p. 115N-122N, 1999.

ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E. T.; MENCONI, A.; ROCHA, T. S.; GONÇALVES, G. A. M. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.190-194, 2009.

APHA, **American Public Health Association**. Compendium of methods for the microbiological of foods. 4th ed. Washington, 2001.

ARAS, Z.; HADIMLI, H. H. Detection and molecular typing of *Clostridium perfringens* isolates from beef, chicken and turkey meats. **Anaerobe**, v.32, p.15-17, 2015.

ARAÚJO, G. C. de; BUENO, M. P.; BUENO, V. P.; SPROESSER, R. L.; SOUZA, I. F. Cadeia produtiva da avicultura de corte: Avaliação da apropriação de valor bruto nas transações econômicas dos agentes envolvidos. **Gestão & Regionalidade**, v. 24, n. 72, p.6-16, 2008.

ARENAS-HERNÁNDEZ, M. M. P.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y.; TORRES, A. G. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. **Current Gastroenterology Reports**, v. 14, p. 386-394, 2012.

ATEBA, C. N.; MBEWE M. Genotypic characterization of *Escherichia coli* o157:h7 isolates from different sources in the north-west province, South Africa, using enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR analysis. **International Journal of Molecular Science**, v.15, p.9735-9747, 2014

AVISITE. **O Portal da Avicultura na Internet**. Estatísticas e preço: Alojamento Regional de pintinhos de corte. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/economia/index.php?acao=alojamentoregional>> Acessado em: 10 novembro. 2015.

BARGHOUTH, S. A. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p.430–444, 2011.

BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Pathology**, v. 45, p 493- 496, 1966.

BAUMS, C.G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.11-16, 2004.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percorso – NEMO**, v.2, n.1, p.25-51, 2010.

BLAAK, H; VAN HOEK, A.H.; HAMIDJAJA, R. A.; VAN DER PLAATS, R. Q.; KERKHOF-DE HEER, L.; DE RODA HUSMAN, A. M.; SCHETS, F. M. Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment. **PLoS One**, v.10, n.8, p.1-23, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 226-258, 26 nov. 1998. Seção I.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução: RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova: o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Coordenação Geral de Programas Especiais – CGPE. Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontroles. Circular 175/2005/CGPE/DIPOA. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de Maio. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Aprovado pelo decreto n.30.691, 29/03/52, alterados pelos decretos n.1255 de 25/06/62, 1236 de 01/09/94, 1812 de 08/02/96, 2244 de 04/06/97. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2008. 241p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. 2015. **Serviço de Inspeção Federal - SIF**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sif>>. Acessado em: 17 novembro. 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Antimicrobianos - Base Teóricas e Uso Clínico**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm> Acesso em 12 novembro. 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Módulo VI. 95p. 2013. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia.asp>>. Acessado em: 05 novembro. 2015.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Divulgação técnica - Salmonela na segurança dos alimentos. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 11-13, 2008.

CASAGRANDE, M. F.; CARDOZO, M. V.; BERALDO-MASSOLI, M. C.; BOARINI, L.; LONGO, F. A.; PAULILO, A. C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. *Clostridium perfringens* in ingredients of poultry feed and control of contamination by chemical treatments. **Journal Applied Poultry Research**, v.22, p.771–777, 2013.

Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: **Annual Report**. 20p. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2013-508c.pdf>>. Acessado em: 17 novembro. 2015.

Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). **Escherichia coli: General Information**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acessado em 05 novembro. 2015.

Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). **Food Safety**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/index.html#c>>. Acessado em 19 fevereiro. 2016.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 5, p. 2138-2140, 2003.

CHAPAVAL, L.; OLIVINDO, C.S.; SOUZA, F.G.C.; ALVES, F.S.F.; FROTA, I.M.A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de Rep-PCR no monitoramento da qualidade do leite da cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, v.1, n. 1, p. 49-56, 2010.

CHERIF, A.; BRUSETTI L, L.; BORIN, S.; RIZZI, A.; BOUDABOUS, A.; KHYAMI-HORANI, H.; DAFFONCHIO, D. Genetic Relationship in the *Bacillus cereus* group by

REP-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific Rep-PCR fragment. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v.94, n.6, p.1108-1119, 2003.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patótipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n.9, p.811-818, 2014.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.26-38, 2010.

Departamento de Agricultura dos EUA, Julho de 2015. Disponível em: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>>. Acessado em: 06 novembro. 2015.

DÜRRE, P. **Handbook on Clostridia**. Taylor & Francis, 2005, 903p.

FARRELL, D. Poultry development review. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, p.1-8, 2013.

European Commission (EC). Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organism resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. Adopted on 3 July 2001, revised on 24 January 2003. **Official Journal of the European Union**. Disponível em: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out108_en.pdf>. Acessado em: 10 novembro. 2015.

European Commission (EC). Commission Decision 2001/471/EC 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. **Official Journal of the European Union**, v.165, p.48–53, 2010. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001D0471&from=EN>>. Acessado em: 21 novembro. 2015.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

FEGAN, N.; VANDERLINDE, P.; HIGGS, G.; DESMARCHELIER, P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. **Applied Microbiology**, v.97, p.362–370, 2004.

FLORES, A. M. P. C.; MELO, C. B. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.37, n.1, p.65-72, 2015.

FOLEY, S. L.; WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; RHODES, B.; FEDORKA-CRAY, P. J.; SIMJEE, S.; ZHAO, S. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella* enterica serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.10, p.3569–3577, 2006.

FRATAMICO, P. M. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. **Molecular and Cellular Probes**, v.17, p.215–221, 2003.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; LUTHY, J. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 10, n.1, p. 31-34, 1990.

GIL DE LOS SANTOS, J.R.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v.35, n.3, 2005.

GOMES, M. J. P.; Gênero *Clostridium* spp. Disponível em: <www6.ufrgs.br/labacvet/files/Clostridium201102.pdf>. Acesso em 30, outubro. 2015. In: **Microbiologia Clínica LABACVET**, II, 2007.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v.85, p.45-62, 2007.

HEIKINHEIMO, A.; LINDSTRÖM, M.; LIU, D.; KORKEALA, H. *Clostridium*. In: LIU, D. **Molecular Detection of Foodborne Pathogens**. Florida, USA: CRC Press, Taylor and Francis Group, 1ª ed., p.145-155, 2009.

ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. Applications of the Rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution **Environmental Microbiology**, v.11, n.4, p.733–740, 2009.

JOHN, F.; SANFORD, W. An {R} Companion to Applied Regression, 2ª ed. Thousand Oaks CA: Sage. URL <<http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>>, 2011.

JUNIOR, C. J.; PAULA, S. R. L.; ORMOND, J. G. P.; BRAGA, N. M. A cadeia da carne de frango: tensões, desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, n.26, p.191-232, 2007.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.123-140, 2004.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.5, p.408-418, 1995.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JÚNIOR, W.C. As *Enterobacteriaceae*. In: **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas colorido**. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan. 6ªed. Medsi, p. 208-299, 2012.

KUMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal Antimicrobiology Chemother**, v. 54, n. 2, p.311-320, 2004.

KURITZA, L.N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, v.44, n.8, p.1457-1465, 2014.

LINDSTRÖM, M.; HEIKINHEIMO, A.; LAHTI, P.; KORKEALA, H. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. **Food Microbiology**, v.28, p.192-198, 2011.

LENTH, R.V. Using the Ismeans Package. The University of Iowa. Updated with Ismeans Version 1.10. July 4, 2013.

LORTIE, L.A.; DUBREUIL, J.D.; HAREL, J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, n.3, p.656–659, 1991.

MAGWEDERE, K; DANG, H. A.; MILLS, E. W.; CUTTER, C.N.; ROBERTS, E. L.; DEBROY, C. Incidence of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* strains in beef, pork, chicken, deer, boar, bison, and rabbit retail meat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.25, n.2, p.254–258, 2013.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.152, p.2-12, 2013.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela. 1 ed. 258p., 2006.

MEAD, G. C. Hygiene problems and control of process contamination, In: Mead, G. C. (Ed.) **Processing of poultry meat**. Elsevier Science, Amsterdam, 183-220, 1989.

MOHAPATRA, B.R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Comparison of five Rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, n. 277, p. 98–106, 2007.

NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v.295, p.443-454, 2005.

NGAMWONGSATIT, B.; TANOMSRIDACHCHAI, W.; SUTHIENKUL, O.; URAIRONG, S.; NAVASAKULJINDA, W.; JANVILISRI, T. Multidrug resistance in *Clostridium perfringens* isolated from diarrheal neonatal piglets in Thailand. **Anaerobe**, v.38, p.88-93, 2016.

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPLEYARD, G.; MIDDLETON, D. M.; FAIRBROTHER, J. M. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 15, p. 242–252, 2003.

OBENG, A. S.; RICKARD, H.; NDI, O.; SEXTON, M.; BARTON, M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. **Veterinary Microbiology**, v.154, p.305–315, 2012.

OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI FILHO, R. L.; BAPTISTA, A. A. S.; ROCHA, T. S. Evaluation of the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated of healthy hens (*Gallus gallus*). **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.2, p.218-221, 2012.

OLATOYE, I. O.; AMOSUN, E. A.; OGUNDIPE, G. A. Multidrug resistant *Escherichia coli* O157 contamination of beef and chicken in municipal abattoirs of Southwest Nigeria. **Nature and Science**, v.10, n.8, p.125-132, 2012.

OLSVIK, Ø.; STROCKBINE, N.A. PCR Detection of Heat-Stable, Heat-Labile, and Shiga-Like Toxin Genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology**. Washington: ASM, p.271-276, 1993.

PAIVA, J. C; BUENO, M.P.; SAUER, L.; SPROESSER, R. L. Evolução da gestão da qualidade segundo o programa nacional de sanidade avícola. **Revista Avicultura Industrial**, n.10, 2005.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p. 1-6, 2014.

PINTO, A. D. M. **Doenças de Origem Microbiana Transmitidas pelos Alimentos**. 1996. Disponível em: <http://www.ipv.pt/millennium/ect4_1.htm> Acessado em: 08 julho. 2015.

PRIÓ P.; GASOL R.; SORIANO R. C.; PEREZ-RIGAU A. Effect of raw material microbial contamination over microbiological profile of ground and pelleted feeds. In: **Brufan J. (Ed.): From Feed to Food**, p.197-199, 2006.

PUERTA-GARCÍA, A.; MATEOS-RODRÍGUEZ, F. Enterobacterias. **Medicine**. v.10, n.51, p.3426-3431, 2010.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2015.

RAJESHWARI, K.; UPPAL, B.; SINGH, R.; TIWARI, G.; MAHATO, A. K. Multidrug resistant enteropathogenic *E. Coli* diarrhea in children. **American Journal of Research Communication**, v.3, n.9, p.27-48, 2015.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; GODARD, C.; WILDEMAUWE, C.; PASTUSZCZAK-FRAK, M.; DE ZUTTER L. Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 1, p.146–152, 2008.

RAVAGNANI, L. K.; AGOSTINIS, R. O.; OTUTUMI, L. K.; LIMA, E. T.; FERNANDES, J. I. M.; MARTINS, L. A. Pesquisa de *Salmonella* spp. em frangos de corte criados em galpões climatizados de uma integração na região Oeste do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.6, p.2327-2336, 2012.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; FITTÉ, A.P.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. Enterica sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.3, p.357-360, 2006.

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, n.1164, p.1-7, 2013.

ROSA, C. O.; GARCIA, R. G.; BINOTTO, E.; RUVIARO, C. F.; NÄÄS, I. A. Características do mercado consumidor de carne de frango em um município de médio porte. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.9, n.17, p.518-532, 2013.

SABAT, A.J., BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJL, J.M.; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, A.W. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveillance**, v.18, n.4, p.1-14, 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.4, n.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. Londres: CSHL Press, p.1448, 2001.

SANDERSON, K. E.; NAIR, S. Taxonomy and species concepts in genus *Salmonella*. In: BARROW, P. A.; METHNER, U. **Salmonella in Domestic Animals**. Boston: CAB International. 2^a ed., p. 1-19, 2013.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.3, p.701-705, 1995.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ISHI, M.; VITTORI, J. Clostridioses em aves. In: BERCHIERI, A. JR.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2 ed., p.533-550, 2009.

SINGH, R. V.; BHILEGAONKAR, K. N.; AGARWAL, R. K. Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. **Journal of Food Safety**, v.25, p.146–156, 2005.

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, n.3, p.496–498, 2014.

SOARES, V. M. **Efeito da aspersão de água sobre a contaminação microbiológica em esteiras transportadoras de cortes de frango**. 2014. 83 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.

SOLTANI, M.; PEIGHAMBARI, S.M.; ASKARI BADOUEI, M.; SADRZADEH, A. Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences polymerase chain reaction (ERIC-PCR). **Iranian Journal of Veterinary Medicine**, v.6, n.3, p.143-148, 2012.

SOUZA, G.C. DE; GONSALVES, H.R.O.; GONSALVES, H. E. O.; COELHO, J.L.S. Característica microbiológica da carne de frango. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.10, n.1, p.12-17, 2014.

SVOBODOVÁ, I.; STEINHAUSEROVÁ, I.; NEBOLA M. Incidence of *Clostridium perfringens* in Broiler Chickens in the Czech Republic. **ACTA Veterinaria Brno**, v.76, p.S25–S30, 2007.

SWOFFORD, D. L. PAUP: Phylogenetic analysis using parcimony, version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TADESSE, D. A.; ZHAO, S.; TONG, E.; AYERS, S.; SINGH, A.; BARTHOLOMEW, M. J.; MCDERMOTT, P. F. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.5, p.741-749, 2012. Disponível em: <www.cdc.gov/eid> Acessado em: 10 novembro. 2015.

TAVARES, L. D. P.; RIBEIRO, K. C. D. S. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente à influenza aviária. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, v.9, n.1, p.79-88, 2007.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M. Prevalência de *Salmonella* Enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas. **Higiene Alimentar**; v.17, n.107, p.52-55, 2003.

THÉVENOT, D.; DELIGNETTE-MULLER, M. L.; CHRISTIEANS, S.; VERNOSY-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.

VASCONCELOS, M. C.; SILVA, C. L.; MEZA, M. L. F. G.; BASSI, N. S. S. Trajetória tecnológica da cadeia produtiva do frango de corte no Brasil. **Iniciação Científica CESUMAR**, v.17, n.1, p.15-27, 2015.

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.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

VOILÀ, M.; TRICHES, D. A cadeia de carne de frango: uma análise dos mercados brasileiro e mundial de 2002 a 2010. **Publicação do Instituto de Pesquisas Econômicas e Sociais – Texto para Discussão**, n.044, p.1-26, 2013.

VON RÜCKERT, D.A.S.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, B.M.; MOREIRA, M.A.S.; RODRIGUES, A.C.A. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.2, p.326-330, 2009.

WAN, L.; WANG, Z.B.; YAN, Q.G.; WANG, X.; LEI, Y.; ZUO, L.; CHENG, Y.; REN, Y.P.; GUO, W.Z. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms revealed by enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) and repetitive extragenic palindrome PCR (Rep-PCR). **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.51, 2011.

XU, X.; CUI, S.; ZHANG, F.; LUO, Y.; GU, Y.; YANG, B.; LI, F.; CHEN, Q.; ZHOU, G.; WANG, Y.; PANG, L.; LIN, L. Prevalence and characterization of cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *Escherichia coli* isolates in retail chicken carcasses and ground pork, China. **Microbial Drug Resistance**, v.20, n.1, p.73-81, 2014.

ZHAO, C.; GE, B.; VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D.G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington, D.C., area. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, n.12, p. 5431–5436, 2001.

ANEXO A – Tabelas das amostras que resultaram em contagens bacterianas de *Clostridium* spp. e Enterobactérias

Tabela A.1. Contagem de colônias de *Clostridium* spp., em UFC.cm⁻², das amostragens efetuadas em esteiras condutoras de cortes de frango antes e depois da limpeza operacional e pré-operacional em três frigoríficos diferentes.

Frigorífico (SH)	Colheita (S)	Contagem de colônias de <i>Clostridium</i> spp.			
		Limpeza Pré Operacional (PO)		Limpeza Operacional (O)	
		Nº amostra*	UFC.cm ⁻²	Nº amostra*	UFC.cm ⁻²
1	1	SH1.S1.BPO	0,0	SH1.S1.BO	0,0
		Média		Média	0,0
		SH1.S1.APO	0,0	SH1.S1.AO	0,0
		Média	0,0	Média	0,0
1	2	SH1.S2.BPO.5	4,70x10 ¹	SH1.S2.BO	0,0
		SH1.S2.BPO.15	3,79x10 ¹		
		Média	0,56x10 ¹	Média	0,0
		SH1.S2.APO	0,0	SH1.S2.AO	0,0
1	3	SH1.S3.BPO.1 SH1.S3.BPO.2 SH1.S3.BPO.3 SH1.S3.BPO.4 SH1.S3.BPO.5 SH1.S3.BPO.6 SH1.S3.BPO.7 SH1.S3.BPO.8 SH1.S3.BPO.10 SH1.S3.BPO.11 SH1.S3.BPO.12 SH1.S3.BPO.13 SH1.S3.BPO.14 SH1.S3.BPO.15	2,11x10 ²	SH1.S3.BO.36 SH1.S3.BO.45	5,08x10 ²
			6,61x10 ²		5,70x10 ²
			1,24x10 ³		
			9,70x10 ²		
			7,05x10 ²		
			6,79x10 ³		
			9,55x10 ²		
			3,39x10 ²		
			1,11x10 ³		
			8,71x10 ²		
			1,23x10 ³		
			5,53x10 ²		
			1,17x10 ³		
			6,44x10 ²		
		Média	2,26x10 ¹	Média	7,18x10 ¹
		SH1.S3.APO.16 SH1.S3.APO.17 SH1.S3.APO.18 SH1.S3.APO.19 SH1.S3.APO.20 SH1.S3.APO.21 SH1.S3.APO.22 SH1.S3.APO.25 SH1.S3.APO.27 SH1.S3.APO.28 SH1.S3.APO.29 SH1.S3.APO.30	1,11x10 ³	SH1.S3.AO.49 SH1.S3.AO.55	6,21x10 ¹
			5,58x10 ³		2,76x10 ²
			1,71x10 ³		
			1,14x10 ³		
			2,71x10 ³		
			1,31x10 ³		
			1,39x10 ²		
			1,30x10 ²		
			5,18x10 ²		
			2,29x10 ²		
			2,91x10 ³		
			1,92x10 ⁴		
		Média	2,45x10 ³	Média	1,16x10 ³

Frigorífico (SH)	Contagem de colônias de <i>Clostridium</i> spp.				
	Colheita (S)	Limpeza Pré Operacional (PO)		Limpeza Operacional (O)	
		Nº amostra*	UFC.cm ⁻²	Nº amostra*	UFC.cm ⁻²
2	1	SH2.S1.BPO.1	4,55x10 ²	NC**	
		SH2.S1.BPO.6	6,97x10 ²		
		SH2.S1.BPO.8	5,76x10 ²		
		SH2.S1.BPO.9	9,24x10 ²		
		SH2.S1.BPO.10	4,55x10 ²		
		SH2.S1.BPO.11	8,49x10 ²		
		SH2.S1.BPO.15	4,77x10 ²		
		SH2.S1.BPO.17	4,55x10 ²		
		Média	2,71x10 ²		
		SH2.S1.APO.20	7,20x10 ²	NC**	
		SH2.S1.APO.21	9,85x10 ¹		
		SH2.S1.APO.22	4,70x10 ²		
		SH2.S1.APO.23	6,82x10 ¹		
		SH2.S1.APO.24	6,52x10 ²		
		SH2.S1.APO.25	4,55x10 ²		
		SH2.S1.APO.28	9,55x10 ¹		
		SH2.S1.APO.29	5,00x10 ²		
		SH2.S1.APO.32	5,38x10 ²		
		Média	2,00x10 ²		
3	1	SH3.S1.BPO	0,0	SH3.S1.BO.37	1,17x10 ²
				SH3.S1.BO.38	3,49x10 ³
				SH3.S1.BO.40	4,70x10 ¹
		Média	0,0	Média	3,96x10 ¹
		SH3.S1.APO.18	7,73x10 ²	SH3.S1.AO	0,0
		SH3.S1.APO.22	1,09x10 ³		
3	2	Média	1,43x10 ²	Média	0,0
		SH3.S2.BPO	0,0	SH3.S2.BO.34	3,94x10 ¹
		Média	0,0	Média	0,28x10 ¹
		SH3.S2.APO.18	5,76x10 ²	SH3.S2.AO.51	5,30x10 ²
		SH3.S2.APO.19	1,09x10 ²		
		Média	4,89x10 ¹	Média	4,08x10 ¹

*SH (Slaughterhouse) – Frigoríficos, S (Samples) – Amostragem, BPO (Before Preoperacional Cleaning) – Antes da limpeza pré-operacional, APO (After Preoperacional Cleaning) – Depois da limpeza pré-operacional, BO (Before operacional Cleaning) – Antes da limpeza operacional, AO (After Operacional Cleaning) – Depois da limpeza operacional. **NC- amostras não foram colhidas.

Tabela A.2. Contagem de colônias de Enterobactérias, em UFC.cm⁻², das amostragens efetuadas em esteiras condutoras de cortes de frango antes e depois da limpeza operacional e pré-operacional em três frigoríficos diferentes.

Frigorífico (SH)	Contagem de colônias de Enterobactérias				
	Colheita (S)	Limpeza Pré Operacional (PO)		Limpeza Operacional (O)	
		Nº amostra*	UFC.cm ⁻²	Nº amostra*	UFC.cm ⁻²
1	1	SH1.S1.BPO.4	2,50x10 ²	SH1.S1.BO.26	4,55x10 ¹
		SH1.S1.BPO.6	1,44x10 ²	SH1.S1.BO.32	0,83x10 ¹
		SH1.S1.BPO.7	1,11x10 ³	SH1.S1.BO.33	4,77x10 ¹
		SH1.S1.BPO.8	2,64x10 ³	SH1.S1.BO.34	3,94x10 ¹
		SH1.S1.BPO.9	2,58x10 ¹	SH1.S1.BO.35	5,61x10 ¹
		SH1.S1.BPO.10	1,01x10 ³	SH1.S1.BO.36	2,08x10 ²
		SH1.S1.BPO.11	8,11x10 ²		
		SH1.S1.BPO.12	9,85x10 ²		
		Média	5,82x10 ²	Média	3,38x10 ¹
		SH1.S1.APO.13	6,36x10 ¹	SH1.S1.AO.37	1,00x10 ³
		SH1.S1.APO.14	1,12x10 ³	SH1.S1.AO.38	1,71x10 ³
		SH1.S1.APO.15	1,06x10 ²	SH1.S1.AO.39	1,13x10 ³
		SH1.S1.APO.21	4,32x10 ¹	SH1.S1.AO.40	5,30x10 ¹
		SH1.S1.APO.22	3,41x10 ¹	SH1.S1.AO.42	1,95x10 ²
		SH1.S1.APO.23	4,32x10 ¹	SH1.S1.AO.43	6,74x10 ¹
		SH1.S1.APO.24	5,83x10 ¹	SH1.S1.AO.44	1,73x10 ³
				SH1.S1.AO.46	1,09x10 ²
				SH1.S1.AO.47	1,23x10 ³
				SH1.S1.AO.48	5,08x10 ¹
			Média	1,22x10 ²	Média
1	2	SH1.S2.BPO.8	5,15x10 ¹	SH1.S2.BO.31	7,27x10 ¹
		SH1.S2.BPO.9	1,67x10 ²	SH1.S2.BO.32	4,09x10 ¹
		SH1.S2.BPO.10	3,33x10 ²	SH1.S2.BO.34	1,15x10 ²
		SH1.S2.BPO.12	1,02x10 ²	SH1.S2.BO.35	2,58x10 ²
		SH1.S2.BPO.13	6,21x10 ¹	SH1.S2.BO.40	4,24x10 ¹
		SH1.S2.BPO.8	5,15x10 ¹	SH1.S2.BO.41	5,91x10 ¹
				SH1.S2.BO.42	6,82x10 ¹
				SH1.S2.BO.43	4,55x10 ¹
				SH1.S2.BO.45	1,82x10 ²
		Média	5,02x10 ¹	Média	5,89x10 ¹
		SH1.S2.APO.16	7,58x10 ²	SH1.S2.AO.49	5,46x10 ¹
		SH1.S2.APO.19	3,79x10 ¹	SH1.S2.AO.50	1,12x10 ²
		SH1.S2.APO.21	6,06x10 ¹	SH1.S2.AO.51	5,15x10 ¹
		SH1.S2.APO.22	3,79x10 ²		
		SH1.S2.APO.24	1,67x10 ²		
			Média	9,35x10 ¹	Média

Frigorífico (SH)	Colheita (S)	Contagem de colônias de Enterobactérias			
		Limpeza Pré Operacional (PO)		Limpeza Operacional (O)	
		Nº amostra*	UFC.cm ⁻²	Nº amostra*	UFC.cm ⁻²
1	3	SH1.S3.BPO.7	9,76x10 ³	SH1.S3.BO	0,0
		Média	4,32x10²	Média	0,0
		SH1.S3.APO.18	7,95x10 ²	SH1.S3.AO.59	6,49x10 ³
		SH1.S3.APO.22	1,64x10 ²		
		Média	6,35x10¹	Média	6,50x10²
2	1	SH2.S1.BPO.4	6,52x10 ¹	NC**	
		SH2.S1.BPO.8	4,55x10 ¹		
		SH2.S1.BPO.15	6,21x10 ¹		
		SH2.S1.BPO.16	9,55x10 ¹		
		Média	1,49x10¹	NC**	
		SH2.S1.APO	0,0		
3	1	Média	0,0		
		SH3.S1.BPO.2	1,30x10 ²	SH3.S1.BO.27	4,55x10 ¹
		SH3.S1.BPO.3	1,52x10 ³	SH3.S1.BO.28	5,08x10 ¹
		SH3.S1.BPO.4	1,08x10 ³	SH3.S1.BO.29	1,07x10 ³
		SH3.S1.BPO.5	1,64x10 ²	SH3.S1.BO.30	3,64x10 ¹
		SH3.S1.BPO.7	3,06x10 ²	SH3.S1.BO.31	4,55x10 ¹
		SH3.S1.BPO.8	1,16x10 ³	SH3.S1.BO.34	6,59x10 ¹
		SH3.S1.BPO.9	7,50x10 ³	SH3.S1.BO.35	9,29x10 ²
		SH3.S1.BPO.10	4,09x10 ¹		
		SH3.S1.BPO.11	7,05x10 ¹		
		SH3.S1.BPO.12	1,88x10 ³		
		SH3.S1.BPO.13	8,53x10 ²		
		Média	7,47x10³	Média	2,11x10²
		SH3.S1.APO.14	1,13x10 ³	SH3.S1.AO.37	1,74x10 ²
		SH3.S1.APO.15	3,52x10 ²	SH3.S1.AO.38	7,35x10 ¹
		SH3.S1.APO.16	2,45x10 ²	SH3.S1.AO.39	8,86x10 ¹
		SH3.S1.APO.17	1,97x10 ²	SH3.S1.AO.40	5,30x10 ¹
		SH3.S1.APO.18	3,94x10 ²	SH3.S1.AO.41	2,30x10 ²
		SH3.S1.APO.19	1,74x10 ²	SH3.S1.AO.42	6,06x10 ²
		SH3.S1.APO.20	2,38x10 ²		
		SH3.S1.APO.21	5,70x10 ²		
		SH3.S1.APO.22	2,38x10 ²		
		SH3.S1.APO.23	2,80x10 ²		
		SH3.S1.APO.24	7,09x10 ²		
		SH3.S1.APO.25	5,61x10 ¹		
		SH3.S1.APO.26	1,61x10 ²		
		Média	2,98x10²	Média	4,58x10²
3	2	SH3.S2.BPO	0,0	SH3.S2.BO.34	3,03x10 ²
		Média	0,0	Média	2,17x10¹
		SH3.S2.APO	0,0	SH3.S2.AO.43	1,32x10 ²
				SH3.S2.AO.51	4,09x10 ¹
		Média	0,0	Média	1,33x10¹

*SH (Slaughterhouse) – Frigoríficos, S (Samples) – Amostragem, BPO (Before Preoperacional Cleaning) – Antes da limpeza pré-operacional, APO (After Preoperacional Cleaning) – Depois da limpeza pré-operacional, BO (Before operacional Cleaning) – Antes da limpeza operacional, AO (After Operacional Cleaning) – Depois da limpeza operacional. **NC- amostras não foram colhidas.