

**RASTREAMENTO DA DISSEMINAÇÃO DE
SALMONELAS EM FRANGOS DE
CORTE A PARTIR DE ALIMENTO
NATURALMENTE CONTAMINADO**

ELISÂNGELA JOSÉ DOS SANTOS

1998

1921

1922

1923

1924

1925

1926

1927

1928

1929

1930

1931

1932

1933

1934

1935

1936

1937

1938

1939

1940

1941

1942

1943

1944

1945

1946

1947

1948

1949

1950

1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

1965

1966

1967

1968

1969

1970

1971

1972

1973

1974

1975

1976

1977

44086

MFN31068

ELISÂNGELA JOSÉ DOS SANTOS

**RASTREAMENTO DA DISSEMINAÇÃO DE SALMONELAS EM
FRANGOS DE CORTE A PARTIR DE ALIMENTO
NATURALMENTE CONTAMINADO**

508
Dissertação apresentada à Universidade Federal
Lavras, como parte das exigências do curso de
Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de
concentração em Microbiologia de Alimentos,
para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora
Iana Pinheiro de Carvalho

LAVRAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
1998

Ficha Catalográfica preparada pela Divisão de processamento Técnico da
Biblioteca Central da UFLA

Santos, Elisângela José dos

Rastreamento da disseminação de salmonelas em frangos de corte a partir de alimento naturalmente contaminado / Elisângela José dos Santos. - Lavras : UFLA, 1998.

75 p. : il.

Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Ave. 2. Frango de corte. 3. Salmonela. 4. Alimento. 5. Nutrição animal. 6. Ração. 7. Bacteria patogênica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-636.513

ELISÂNGELA JOSÉ DOS SANTOS

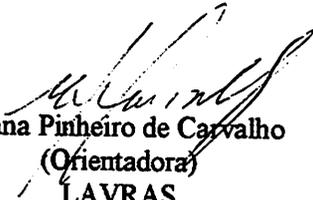
**RASTREAMENTO DA DISSEMINAÇÃO DE SALMONELAS EM
FRANGOS DE CORTE A PARTIR DE ALIMENTO
NATURALMENTECONTAMINADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
Lavras, como parte das exigências do curso de
Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de
concentração em Microbiologia de Alimentos,
para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 21 de agosto 1998

Prof. Dr. Luiz Ronaldo Abreu

Prof. Dr. Antônio Gilberto Bertechini


Eliana Pinheiro de Carvalho
(Orientadora)
LAVRAS
MINAS GERAIS- BRASIL

OFEREÇO a Deus

DEDICO à minha família

Agradecimentos

À Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho pela dedicação, orientação e profissionalismo.

Ao CNPQ e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

À Superintendência Geral do LARA e em especial ao veterinário Ronaldo Linares Sanches pela colaboração técnica e concessão do uso do laboratório de Microscopia

À pesquisadora Dra. Maria Lúcia Pereira pelas sugestões, auxílio técnico e concessão do uso do Laboratório de Anaeróbios da Divisão de Bromatologia do Instituto Otávio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias.

Ao Sidney do Carmo pela boa vontade e auxílio fotográfico.

À pesquisadora Dra. Eliane Moura Falavina dos Reis e Dr. Ernesto Hofer do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz pela tipificação das salmonelas.

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras pela oportunidade do trabalho interdisciplinar.

À professora da Universidade Federal de Viçosa Dra. Marlene Isabel Vargas Vilorio pelo auxílio técnico.

Ao bolsista Bartolo Elias Barrios-Barrios pela colaboração dada no desenvolvimento das análises microbiológicas, apoio e estímulo ao trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras pelo apoio na fase experimental.

Aos amigos Débora, Elaine, Érica, Geraldo, Kelly, Margarita e Paulo

pela amizade, estímulo ajuda valiosa.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus pela força em todos os momentos, principalmente os de maior dificuldade “porque quando sou fraco então é que sou forte”(2 Co 12:10).

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 Introdução Geral	01
2 Referencial Teórico	03
2.1 Incidência, distribuição e importância econômica	03
2.2 Patogenicidade	04
2.3 Isolamento de <i>Salmonella</i> sp nas matérias-primas e rações	05
2.3.1 Componentes da ração de origem vegetal contaminados	08
2.4 Fatores que afetam a colonização de <i>Salmonella</i> sp nas aves	09
2.5 Abatedouro	10
2.6 Indicadores microbianos	12
2.7 Métodos de controle e eliminação de salmonelas	13
2.7.1 Peletização de rações	13
2.7.2 Utilização de carboidratos	13
2.7.3 Tratamentos quimioterápicos	14
2.7.4 Exclusão competitiva	15
2.7.5 Imunização	15
2.7.6 Biosseguridade	16
3 Referências Bibliográficas	18
CAPÍTULO 1: Avaliação microbiológica de ingredientes e rações	22
Resumo	22
Abstract	23
1 Introdução	24
2 Material e Métodos	26
2.1 Material	26
2.1.1 Coleta de amostras de rações e farinhas de carne e ossos de diferentes frigoríficos	26
2.2 Métodos para isolamento de salmonelas	26
2.2.1 Pré-enriquecimento	27
2.2.2 Enriquecimento seletivo	27
2.2.3 Plaqueamento em ágar de cultivo	27
2.2.4 Triagem de colônias suspeitas	28
2.2.5 Identificação bioquímica	28
2.3 Análises complementares	28
3 Resultados e Discussão	30
3.1 Análise microbiológica	30
3.2 Avaliação microscópica	34
4 Conclusões	37
5 Referências Bibliográficas	38

CAPÍTULO 2: Rastreamento epidemiológico de sorovares de <i>Salmonella</i> em frangos de corte a partir de alimento naturalmente contaminado	41
Resumo	41
Abstract	42
1 Introdução	43
2 Material e Métodos	45
2.1 Material	45
2.1.2 Coleta de amostras de rações e farinhas de carne e ossos de diferentes frigoríficos	45
2.1.3 Coleta de material da cloaca dos pintinhos	45
2.1.4 Coleta de material da vesícula biliar e intestino das aves	46
2.2 Métodos e procedimentos para o isolamento de <i>Salmonella</i>	46
2.2.1 Pré-enriquecimento de rações e matérias-primas	47
2.2.2 Enriquecimento em caldos seletivos	47
2.2.3 Plaqueamento seletivo	47
2.2.4 Triagem e identificação bioquímica	48
2.2.5 Sorotipagem	48
3 Resultados e Discussão	49
3.1 Salmonelas em rações e matérias-primas de origem animal	49
3.2 Sorovares de <i>Salmonella</i> nas aves e associação com o grupo alimentar	52
4 Conclusões	55
5 Referências Bibliográficas	56
CAPÍTULO 3: Avaliação do perfil higiênico-sanitário e presença de <i>Salmonella</i> em frango “in natura”	58
Resumo	58
Abstract	59
1 Introdução	60
2 Material e Métodos	62
2.1 Material	62
2.1.2 Coleta de amostras de carcaças de frangos	62
2.2 Métodos	63
2.2.1 Pré-enriquecimento de rações e matérias-primas	63
2.2.2 Pré-enriquecimento de carcaças de frango	63
2.2.3 Enriquecimento seletivo	63
2.2.4 Plaqueamento em ágar de cultivo seletivo	64
2.2.5 Triagem de colônias suspeitas	64
2.2.6 Identificação bioquímica	64
2.2.7 Tipificação sorológica	65
2.3 Enumeração de coliformes	65
3 Resultados e Discussão	66
4 Conclusões	70
5 Referências Bibliográficas	71

RESUMO

SANTOS, Elisângela José. Rastreamento da disseminação de salmonelas em frangos de corte a partir de alimento naturalmente contaminado. Lavras: UFLA, 1998. 73p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos)*

Um estudo epidemiológico da ocorrência de *Salmonella* em frangos de corte foi realizado na Universidade Federal de Lavras, com amostragens coletadas por um período de 43 dias. Este experimento objetivou estudar a possibilidade da relação entre a infecção por *Salmonella* sp e a ingestão de alimento contaminado. Foram estudadas 67 amostras compreendidas em farinhas de carne e ossos (10), farelo de soja (1), farelo de milho (1), rações (11), suabe cloacal (11), vesícula biliar (11), intestino (11) e carcaças (11). As amostras da vesícula biliar, intestino e carcaças se originaram de 33 aves coletadas de acordo com sua alimentação. Foi efetuado um controle microbiológico e de adulterações de rações e matérias-primas, avaliando a qualidade destes produtos através da pesquisa de grupos microbianos indicadores de contaminação como contagem de mesófilos, fungos, coliformes fecais e presença de *Salmonella*. Ainda para obtenção sumária da qualidade nutricional das farinhas de carne e ossos e detecção de possíveis adulterações, foi efetuada a análise de microscopia. Utilizaram-se como regra geral para as análises microbiológicas os métodos descritos pela “American Public Health Association” APHA, Speck, 1984 com algumas modificações. A microscopia foi realizada de acordo com a metodologia preconizada por A.A. F.M., 1992. Foram encontrados nos alimentos das aves os sorotipos *S. Senftenberg*, *S. Infantis*, *S. Give* e *S. Fyris*. Nas aves os sorovares presentes se ativeram a *S. Infantis*, *S. Bredeney*, *S. Senftenberg* e *S. Give*, sendo que em 72,73% dos grupos de aves, houve relação restrita entre os sorovares identificados no alimento com as respectivas aves. Nos vários segmentos se comprovou a existência de múltiplas fontes de contaminação na criação de frangos de corte.

Comitê Orientador: Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Orientadora)

ABSTRACT

SANTOS, E. J. Epidemiological Tracking of Serovars of *Salmonella* in Broiler Chickens Through Feed Contamination. Lavras: UFLA, 73p. (Dissertation - Master Program in Food Science)

An epidemiological survey of the occurrence of *Salmonella* serotypes was conducted at the Universidade Federal de Lavras. The samples were collected at interval of 43 days. This experiment was undertaken to determine the possible *Salmonella* sp infection of specific broiler groups and its relationship to the poultry diets. Sixtyseven samples which consisted of meat and bone meals (10), soybean meal (1), corn meal (1), rations (11), cloacal swab (11), bile vesicle (11), carcasses (11) and intestine (11). The samples of bile vesicle, carcasses and intestine originated from 33 birds collected according to their feeding. The microbiological and adulteration control of rations and raw materials in its pose aiming to evaluate the quality of those products through research into microbial groups which denote contamination as a count of mesophiles, fungi, fecal coliforms and presence of *Salmonella*. Still, for brief obtaining of nutritional quality of meat and bone meals and detection of possible adulterations, a microscopic analysis was performed. As a general rule for the microbiologic analyses the methods reported by the American Public Association- APHA, Speck, 1984 were utilized. Microscopy was achieved according to the methodology advised by A.A.F.M., 1992. In the feeds of the birds the following serovars were found: *S. Senftenberg*, *S. Infantis*, *S. Give* and *S. Fyris*. In 72.73 % of the groups of birds, there was a close relationship between three serovars found in the feeds or feedstuffs and the respective bird. The presence of the serovar *S. Infantis*, *S. Bredeney*, *S. Senftenberg* and *S. Give* in birds can be associated with the intake of contaminated feed. In several segments, the existence of multiple sources of contamination is confirmed in broiler production.

Guidance Committee: Dr Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

1 INTRODUÇÃO GERAL

Na avicultura, o controle da *Salmonella* depende de um monitoramento simultâneo, da produção dos pintinhos à criação, do abate ao processamento de carcaças.

As aves se infectam por via oral e tem sido grande a especulação de que seu alimento funcione como importante veículo de contaminação. Apesar de toda a ênfase mundial concernente ao problema da contaminação de rações e suas matérias primas, principalmente as farinhas de origem animal (Silva et al. 1973, Berchieri Júnior et al 1984, Berchieri Júnior et al. 1989, Berchieri Júnior 1993, Bangtrakulnonth et al. 1994, Saitanu et al. 1994, Malmqvist et al. 1995, Veldman et al. 1995) e, em nosso meio, as informações ainda são exíguas, necessitando de detalhes sobre a ocorrência de sorotipos de *Salmonella* em aves em diferentes situações clínicas e epidemiológicas e sua relação com os sorotipos encontrados nas rações e seus constituintes. As possíveis fontes de salmonelas são resultantes das influências de fatores exógenos, particularmente, à veiculação através de rações contaminadas, associadas à introdução de aves portadoras no plantel ou, em menor escala, por interferência do fenômeno de domiciliarização de outras espécies animais, isto é, cohabitantes nesse nicho ecológico.

As salmonelas são microorganismos que possuem mecanismos de adaptação a diferentes hospedeiros e apresentam variabilidade de resistência às condições ambientais, o que lhe confere um extraordinário número de fontes de infecção, envolvendo praticamente todo o escalão filogenético dos vertebrados,

alguns dos quais, fonte de proteína animal para o homem.

Em relação às salmonelas presentes nas aves, a identificação conclusiva do agente etiológico propicia o conhecimento dos sorovares de *Salmonella* no plantel avícola e também o rastreamento do foco de infecção, visando, assim, à implantação de medidas de controle.

Dentre as medidas cabíveis à adequação de um controle de qualidade de rações e ingredientes, destacam-se a seleção de matéria prima e peletização (Cox et al. 1986). Concernente a medidas de controle temos o tratamento químico, adição de lactose e ácidos orgânicos na ração, exclusão competitiva e vacinação de aves (Morishita et al. 1982, Villegas 1993, Bates & Granshaw, 1995, Corrier et al. 1997).

Contudo, as medidas profiláticas ou corretivas de combate à salmonelose, se efetuadas isoladamente, apenas irão servir para mascarar o problema e a este respeito vários autores têm sugerido a adoção do sistema de Análise de Perigos em Pontos Críticos de Controle (APPCC) que tratam da questão como um todo (Saitanu et al 1994, Malmqvist et al 1995 e Felipe et al 1995).

Assim sendo no presente trabalho foi investigada a disseminação de sorotipos de *Salmonella* em frangos de corte a partir de rações fabricadas com farinhas de carne e ossos naturalmente contaminadas por este patógeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Resultante da excelente propagação no meio, as salmonelas conferem uma das mais problemáticas zoonoses para a saúde pública em todo o mundo, em razão da elevada endemicidade, alta morbidade e, acima de tudo, pela dificuldade no controle.

2.1 Incidência, distribuição e importância econômica

Países da Europa e Estados Unidos tiveram na história de sua indústria avícola um período de incertezas quanto à qualidade de seus produtos, tendo ainda que conviver com a perda da confiança do público consumidor que, ao longo do tempo, deixou de ver o produto como forte e saudável para vê-lo como estigma de um constante e reiterado veículo de agentes causadores de toxinfecções alimentares.

Os alimentos de origem animal continuam a ser os principais responsáveis pela infecção humana, entre eles, a carne de aves, ovos e derivados cárneos em geral que em levantamentos recentes têm sido apontados como os responsáveis pelas salmoneloses humanas.

Dentre as toxinfecções alimentares relatadas atualmente, a incidência de salmonelose representa apenas uma pequena fração do número atual de casos existentes. O número de surtos de infecções estimados a cada ano tem sido estimada em 20-100 vezes maior que o número de infecções relatadas. O número

de casos de salmonelose tem aumentado consideravelmente nos EUA, Canadá, Inglaterra e País de Gales como citado por Felipe et al (1995).

Chalker & Blaser (1988) realizaram um estudo para levantamento do número de infecções por salmonelas através de três diferentes métodos e estimaram que devem ocorrer, a cada ano, cerca de 800 mil ou 3 milhões, ou 700 mil casos em humanos somente nos EUA. No Brasil, segundo Trabulsi & Pasternak (1981), os registros existentes são limitados e não permitem a avaliação global do problema.

A concentração demográfica em áreas urbanas juntamente com a crescente utilização da mão de obra feminina na economia formal, provocaram alterações nos hábitos alimentares, aumentando substancialmente as ocasiões em que as refeições são feitas fora de casa. Tiejtjen & Fung (1995) afirmam que esta tendência tem sido considerada como um dos fatores que mais contribuíram para o incremento das taxas de toxinfecções alimentares, uma vez que de acordo com Chalker & Blaser (1988) cerca de 40% dos surtos são atribuídos ao consumo de refeições em larga escala.

Medidas higiênico-sanitárias são necessárias a fim de impedir processos patológicos, como toxinfecções causadas por salmonelas ou outros contaminantes que poderão vir a contaminar produtos principalmente de origem animal.

2.2 Patogenicidade

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos gram negativos em sua maioria movéis através de flagelos peritríquios. São microrganismos hábeis para sobreviver e multiplicar-se no ambiente, sendo este um fator importante para sua transmissão. O crescimento pode ocorrer em pH de 4 a 8, temperaturas de 7°C a 47°C e atividade de água acima de 0,94.

Acima de 2000 sorotipos de salmonelas já foram isolados e caracterizados. Alguns destes distinguem-se pela adaptação a hospedeiros específicos nos quais causam patologias definidas (*S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em aves e perus, *S. Dublin* em bovinos, *S. Choleraesuis* em suínos, *S. Typhi* em humanos). Um segundo grupo destas bactérias adapta-se a diferentes espécies animais, podendo invadir, estabelecer-se e multiplicar causando infecções de grau variável na sua gama de hospedeiro. Finalmente, um terceiro grupo de salmonelas, associadas a patologias graves, pode ocorrer em animais domésticos, alimentos para o consumo humano e componentes da ração animal (Lunge et al, 1996).

S. Pullorum e *S. Gallinarum* são dois sorotipos relativamente específicos das aves, o que no entanto não significa que sejam apatogênicas para outras espécies. Mc Cullough & Eisele (1951) determinaram que uma dose infectante de $1,2 \times 10^9$ organismos de *S. Pullorum* era capaz de produzir sintomas de toxinfecção alimentar em humanos e eram necessário apenas 125.000 organismos de *S. Bareilly* para desencadear doença severa em humanos. Já Blaser & Newman (1982) afirmaram que apenas dezessete organismos são suficientes para iniciar um processo de toxinfecção no homem ou dependendo das condições apenas um.

2.3 Isolamento de *Salmonella* sp nas matérias-primas e rações

As aves se situam entre os mais destacados disseminadores de infecção de salmonelas, como já relatado em vários trabalhos no Brasil e exterior, onde rações e seus ingredientes estão literalmente envolvidos como causa primordial da veiculação de sorovares de *Salmonella* (Silva et al. 1973, Berchieri et al 1984, Berchieri et al. 1989, Berchieri et al 1993, Bangtrakulnonth et al. 1994, Saitanu et.al. 1994, Malmqvist et al. 1995, Veldman et al. 1995).

A literatura concernente à presença de bactérias patogênicas em produtos de origem animal conceituam particularmente as farinhas de carne e similares como excelentes veiculadores de microrganismos do gênero *Salmonella* aos animais (Silva et al. 1973, Berchieri et al 1984, Berchieri et al. 1989, Malmqvist et al. 1995).

Erwin(1955) trouxe um dos primeiros estudos de detecção de *Salmonella* à partir de “alimentos comerciais preparados” para o consumo de aves. Desde então efetuou-se uma maior conscientização do papel das rações e subprodutos como disseminadores da *Salmonella* na avicultura industrial.

Willians (1981) cita que *Salmonella* Typhimurium e *S. Bareilly* isoladas em alimentos para o consumo de aves já vêm sendo relatadas a mais de quarenta anos.

Morehouse & Wedman (1961) efetuaram um levantamento sobre os agentes patogênicos presentes em subprodutos de origem animal e mostraram que cinco produtos tiveram particular importância devido à alta porcentagem de amostras positivas para *Salmonella*. Subprodutos de abatedouro avícola como ovos, carne, farinha de carne e ossos e ração canina foram responsáveis por 71% do total de isolamentos. Os sorotipos que ocorreram com maior frequência foram *S. Montevideo*, *S. Senftenberg*, *S. Typhimurium*, *S. Cubana*, *S. Infantis* e *S. Oranienburg*. Os autores observaram que *S. Typhimurium* foi o sorotipo que prevaleceu nos subprodutos avícolas e nas rações.

Para se detectar o nível de contaminação por salmonelas em amostras de farinha protéica animal (farinha de peixe, farinha de penas e farinha de carne e ossos), Willians Júnior et al (1969) conduziram um estudo com 311 amostras analisadas num período de 10 meses. Os autores chamaram a atenção para a maior frequência de isolamentos do sorotipo *S. typhimurium*. A presença de *Salmonella* em lotes de farinha de carne foi detectada em 86% das amostras

avaliadas, em 57% das amostras de farinha de penas e em 18% das farinhas de peixe.

A importância da carne das aves como fonte protéica à alimentação humana e o fato de veicularem salmonelas tornando-se fonte de infecção ao homem, foi destacado por Berchieri Júnior et al (1983) em estudo sobre a presença da *Salmonella* em amostras de farinha de origem animal destinada à fabricação de ração. A percentagem de amostras positivas na farinha de carne foi de 14% e nas farinhas de penas 4%, sendo que as demais matérias-primas (farinha de sangue, farinha de peixe, farinha de ostra, farinha de ovo e farinha de vísceras) apresentaram um percentual de positividade baixo.

Berchieri Júnior et al (1984) também isolaram e identificaram salmonelas em matérias-primas de rações de origem animal. Foram analisadas amostras de farinha de carne, de penas e vísceras e de ossos autoclavados, oriundas de três diferentes fábricas de ração do estado de São Paulo onde 38% das amostras examinadas estavam contaminadas com salmonelas.

Em nível de granja avícola comercial, Berchieri Júnior et al (1989) isolaram vinte e dois sorotipos de salmonelas em amostras de farinhas de carne, ração, cama das aves e fezes de rato. A constatação da presença de 19 sorotipos de *Salmonella* em uma amostra de farinha de carne levou os autores a considerá-la como o principal agente contaminante. A presença de *Salmonella* em fezes de ratos coletadas na fábrica de ração anexa à granja sugerem uma outra fonte potencial de introdução da bactéria no ambiente de criação. Os autores argumentaram que a associação desses resultados devem ser considerados para o estabelecimento progressivo de programas de controle sanitário efetivos e factíveis com os atuais sistemas de exploração avícola.

Examinando a presença de salmonelas em ração para aves de estabelecimentos comerciais Berchieri Júnior et al (1993) encontraram um

percentual de 10% de amostras contaminadas e ainda sugerem que os resultados negativos não significam ausência deste patógeno na dieta.

Saitanu et al. (1994) isolaram salmonelas de ingredientes de rações e de rações de diferentes estabelecimentos públicos e comerciais da Tailândia. A presença deste patógeno foi constatada em 57, das 812 amostras estudadas.

Veldman et al (1995), investigando a incidência de contaminação de produtos destinados ao consumo animal, constataram que os alimentos mais contaminados foram as rações fareladas sendo que em 21% das amostras foram encontradas salmonelas. Os autores chamaram atenção para o fato de que estes alimentos, quando peletizados, apresentaram 1,4% de contaminação. Foi observado pelos mesmos autores que de 130 amostras de farinhas de peixe, a contaminação pela mesma bactéria foi de 31%; e de 83 amostras de farinhas de carne e ossos foi de 4%.

2.3.1 Componentes da ração de origem vegetal contaminados

Os componentes de origem vegetal são de suma importância na fabricação da ração para a alimentação de animais por possuir em sua composição grande quantidade de aminoácidos essenciais. É oportuno enfatizar que, de acordo com os poucos levantamentos existentes, sementes e grãos de oleaginosas em geral possuem uma baixa incidência de contaminação por salmonelas (1-3%) comparados aos ingredientes obtidos de subprodutos de origem animal.

Verdi et al (1996) analisando farelo de soja, constataram que a incidência de contaminação por *Salmonella* sp foi de 1% e de *Escherichia coli* 21%, também verificaram presença de outras enterobactérias e identificaram 05 gêneros de fungos e leveduras comprovando que sob o ponto de vista

bacteriológico, as amostras eram consideradas impróprias para o consumo.

O alto índice de contaminação por salmonelas (27%) verificado por Veldman et al (1995) nos grãos de milho, confirma a extensão deste microorganismo aos produtos crus e de origem vegetal, onde o controle microbiológico deve ser estendido.

2.4 Fatores que afetam a colonização de *Salmonella* sp nas aves

O grande enigma da salmonelose reside na forma clínica quase sempre inaparente e rotulada em patologia aviária como infecções paratíficas ou portadores são (Hofer et al. 1997).

A suscetibilidade das aves à colonização por *Salmonella* decresce com a idade, portanto, é maior nas primeiras semanas de vida da ave e raramente ocorre doença clínica em aves com mais de 3 semanas de idade (Bailey, 1994). Entretanto, estas aves infectadas serão na sua maioria portadoras, excretando através das fezes o microorganismo e contribuindo para a continuidade do ciclo de contaminação através do qual podem ficar contaminados abatedouros e produtos avícolas. O aumento de resistência adquirida com a idade tem sido considerado como consequência da instalação gradual de microrganismos que compõem a microbiota intestinal (Bailey 1994, Cox 1989).

O controle do crescimento de *Salmonella* durante o período inicial de criação é estritamente necessário, pois assim se evita a colonização intestinal, além de barrar também a propagação destes microorganismos para outras espécies animais e para seus produtos, fonte de proteína animal para o homem e outras espécies.

O rápido desenvolvimento da microbiota intestinal em aves adultas aumenta a resistência das aves às infecções como argumentado no trabalho de

Cox et al (1990).

Quando as aves são submetidas a condições desfavoráveis de criação como privação de água, restrição alimentar, altas temperaturas e alta densidade populacional, provavelmente diminuirá a resistência à colonização por *Salmonella* em detrimento do estresse causado por tais fatores (Bailey, 1994).

Qualquer doença que determine um quadro imunossupressivo como gumboro ou micotoxicose, além de doenças concorrentes como a coccidiose, que determinam a integridade intestinal, acabam por aumentar a susceptibilidade a colonização por *Salmonella* sp.

A utilização de antibióticos na terapêutica veterinária e como promotores de crescimento tem levado, devido ao uso indiscriminado, ao surgimento de resistência dos microrganismos à grande variedade de agentes antimicrobianos empregados em rações (Silva et al. 1984, Berchieri et al. 1985).

2.5 Abatedouro

Na maioria dos países, a propagação de salmonelas ocorre devido ao extraordinário crescimento da indústria avícola, com de uma visão econômica tipicamente de produção sem argumento de qualidade.

As aves sadias são responsáveis pela contaminação cruzada que se dá principalmente em abatedouros, comprometendo o produto final que será consumido pelo homem (carcaças, embutidos) ou participando como ingredientes (subprodutos) das rações. Dessa forma, a contínua reintrodução de salmonelas em plantéis avícolas estabelece um círculo vicioso que se inicia com o consumo da ração contaminada e se perpetua no ambiente, particularmente no frigorífico avícola. Nos trabalhos de Berchieri Júnior et al (1987) e Costa et al (1996), fica enfatizado que o frigorífico se constitui um ambiente de disseminação das

salmonelas no meio ambiente.

A incidência de contaminação varia consideravelmente dependendo do nível de infecção nos lotes das aves e tempo de viagem até o abatedouro. Uma alta prevalência de contaminação de aves por salmonelas foi relatada por Irwin et al (1994) no Canadá. As taxas de contaminação por *Salmonella* foram referentes a 86,7 % em lotes de perus, 52,9% em rações comerciais e 76,9% em lotes de frangos.

Em frangos infectados, os cecos são os locais primários de localização da *Salmonella* e a coprofagia anterior ao abate é um dos meios de contaminação cruzada (Moran Júnior & Bilgili, 1989).

O rápido crescimento das bactérias pode ser associado ao acentuado estresse que ocorre durante o transporte levando a uma maior contaminação da ave abatida. Assim o número de carcaças positivas à *Salmonella* aumenta rapidamente após a liberação do conteúdo intestinal durante a evisceração e através da propagação que se dá entre as carcaças nas operações da linha de abate.

A imersão no tanque de escaldagem, a passagem pelas máquinas depenadeiras, a evisceração manual e mecânica resultam na transferência e multiplicação de salmonelas em carcaças. Devido a tais peculiaridades no frigorífico avícola, as bactérias disseminam-se facilmente no ambiente, comprometendo a qualidade das carcaças e também os subprodutos que entram na composição das rações animais. Com isso a mais alta tecnologia no abate e processamento das aves não tem como evitar carcaças positivas a samonelas, já que aves infectadas são trazidas ao interior do abatedouro.

A presença de *Salmonella* foi detectada por Berchieri Júnior et al (1987), nas fezes de aves que entravam no abatedouro até os produtos finais como carcaças e produtos para elaboração de farinhas. Neste trabalho foram isolados 9

diferentes sorotipos, sendo o *S. Typhimurium* o mais freqüente.

Estudando carcaças de frangos provenientes de abatedouros com e sem controle de fiscalização, Costa et al (1996) verificaram que, do total de 105 amostras de carcaças analisadas, 10,4% estavam contaminadas por salmonelas. Não foi isolado *Salmonella* sp em toda amostragem e este fato pode ser explicado uma vez que alguns lotes de frangos que são provenientes de diferentes locais, chegam aos abatedouros infectados pela bactéria e podem disseminá-la para as carcaças durante o abate e processamento, enfatizando a importância do controle da salmonelose em nível de granja e sua relação à contaminação do abatedouro.

2.6 Indicadores microbianos

Indicadores microbianos são grupos ou espécies de microrganismos utilizados a fim de avaliar a inocuidade dos alimentos quanto à provável presença de microrganismos patogênicos e suas toxinas microbianas, assim como qualidade microbiológica. Os microrganismos indicadores possuem características que permitem sua enumeração ou contagem com maior facilidade. Sua presença ou concentração significativamente elevada nos alimentos indica que esses produtos estiveram expostos a condições que poderiam ter permitido a introdução de organismos perigosos e/ou a multiplicação de espécies infecciosas ou toxigênicas (ICMSF, 1983).

Cada alimento é avaliado por um ou mais microrganismos indicadores de acordo com suas características intrínsecas: composição química (nutrientes), atividade de água, pH e potencial de oxi-redução; e características extrínsecas: temperatura de acondicionamento e umidade relativa do ar principalmente (ICMSF, 1988).

2.7 Métodos de controle e eliminação das salmonelas

2.7.1 Peletização de rações

Geralmente os ingredientes são submetidos a cozimento (peletização, extrusão) o que habitualmente reduz ou elimina as bactérias. Um passo importante no controle da colonização, no trato gástrico intestinal, é a utilização de ingredientes livres de salmonelas (Cox et al,1986).

Jones et al, 1991 encontraram 35% de positividade em rações após a sua produção na fábrica e 6,3% em rações peletizadas no mesmo ambiente com uma redução de 82%. A redução da contaminação é relacionada à quantidade de umidade da ração, tempo e temperatura de armazenamento, número de salmonelas presentes, eficiência da transferência de calor e umidade no processo e a resistência térmica da cepa envolvida. Argumenta-se que a recontaminação dos ingredientes reside no principal problema após a peletização.

Veldman et al (1995) enfatizam a importância da peletização, já que em ração farelada foi encontrado um índice de contaminação por salmonela de 21%, e em produtos peletizados o índice caiu para 1,4%. Ainda, no mesmo trabalho, a temperatura utilizada para a peletização é abordada como ponto chave na descontaminação já que de 60°C a 75°C foram encontradas amostras ainda positivas para *Salmonella*.

2.7.2 Utilização de carboidratos

Segundo Loach(1989), se as condições à colonização por salmonelas se tornarem desfavoráveis durante as primeiras semanas de vida da ave, até a flora

madura se estabelecer, então a incidência destes microrganismos na ave adulta irá decrescer.

Morisha et al (1982) afirmam que a colonização por salmonelas ocorre no intestino delgado, provavelmente devido à menor motilidade, o pH alcalino. Verifica-se que com o bloqueio de aderência do microrganismo ao epitélio intestinal é possível evitar a infecção.

Nesse sentido vêm sendo empregados uma série de carboidratos ou compostos afins. A lactose presente no leite é uma alternativa nos tratamentos para se reduzir o número de organismos de *S. Typhimurium* em frangos de corte, conforme Loach et al (1990). Os autores adicionaram o soro de leite na ração a 5%, durante os primeiros dez dias de alimentação das aves e concluíram que o tratamento reduziu significativamente a concentração de salmonelas dos cecos.

Segundo relato dos autores Corrier et al (1997) e Morishita et al (1982), o número de salmonelas presentes nos cecos ou carcaças de aves foram ou não reduzidos através da utilização de vários carboidratos, contudo, as bactérias não foram totalmente eliminadas, permitindo assim a possibilidade de disseminação contínua do patógeno no ambiente. Além disso, a viabilidade em se utilizar tais açúcares em situação de campo como agente controlador da *Salmonella* nas aves é limitada por seu alto custo.

2.7.3 Tratamentos quimioterápicos

A quimioterapia tem sido de grande ajuda para reduzir a mortalidade em aves infectadas, entretanto, o uso periódico e indiscriminado de antibióticos vem auxiliando o processo de seleção de linhagens de *Salmonella* resistentes, e conseqüentemente colaborando na seleção de aves portadoras crônicas que são a principal fonte de disseminação deste patógeno (Villegas, 1993).

2.7.4 Exclusão competitiva

A exclusão competitiva utiliza o princípio da microbiota de aves adultas como barreira de proteção frente a patógenos como *Salmonella* sp e *Campylobacter*. De acordo com os diferentes microrganismos administrados, as respostas são variáveis e, em geral, têm sido bem aceitas pela comunidade científica (Bailey, 1994).

As salmonelas possuem mecanismos de adaptação a diferentes hospedeiros e apresentam variabilidade de resistência às condições ambientais. Quando administrados competidores exclusivos, há uma modificação do ambiente intestinal, passando este a não favorecer a colonização pelas salmonelas. Este mecanismo de ação tipo barreira protetora previne a entrada de uma determinada bactéria em um local específico, devido ao sítio de ligação desta já estar ocupado por outro organismo. A atuação dos microrganismos está na produção de metabólitos (ácidos graxos voláteis e colicinas) pela microbiota natural, especialmente a microbiota anaeróbica. De acordo com os trabalhos de Corrier et al 1995 e Schneitz & Nuotio 1991 a aplicação da competição exclusiva reduz mas não elimina totalmente a colonização por *Salmonella* sp das aves.

Alguns estudos adotam a competição exclusiva em conjunto com a adição de carboidratos para efetiva redução da colonização por salmonelas (Bailey, 1994).

2.7.5 Imunização

Esta é uma medida que está estritamente ligada à biosseguridade na

indústria avícola e vem saindo da fase experimental para se tornar realidade, contudo a maioria das vacinas se encontram no estágio de desenvolvimento e sua utilização é limitada a animais de laboratório (Eskelund 1992, Avellaneda 1993, Villegas, 1993).

2.7.6 Biosseguridade

As principais medidas de prevenção passam obrigatoriamente pelo controle das rações e os cuidados de manejo e reposição de lotes.

As medidas de controle podem ser exercidas principalmente através da limpeza, higiene e correto manuseio dos equipamentos de distribuição, comedouros e bebedouros. Cuidados com higiene pessoal, sapatos, roupas e mãos de tratadores, principalmente se não forem exclusivos da área, devem ser constantemente renovados, bem como proibida a circulação entre lotes de aves de idades diferentes.

Além da peletização, a sanitização com formaldeído e/ou produtos de todo o equipamento responsável pela mistura, estocagem e transporte da ração, pode contribuir efetivamente para minimizar o processo de transmissão de patógenos.

A área de galpões deve ser restrita ao acesso de outros animais e visitas. Ratos, baratas, camundongos, pombos, pardais, gatos, cães entre outros são disseminadores de patógenos através de suas secreções e fezes podem contaminar o ambiente de produção avícola. Portanto, estes cohabitantes do ambiente de criação precisam ser exterminados, assim como também fezes, resto de cama aderidos a sacos de ração, botas e caixas de pintos.

Outra forma de controle seria a colonização integrada (Bailey, 1994). Esta técnica combinaria a competição exclusiva, boas práticas de higiene na

granja, amostragem de pontos críticos e vacinações (Eskelund 1992, Avellaneda 1993, Villegas, 1993). Vários autores como Saitanu et al (1994), Malmqvist et al (1995) e Felipe et al (1995) têm sugerido em suas pesquisas a implementação de programas de controle das salmoneloses como o método de Análise de Perigos em Pontos Críticos de Controle (APPCC) como forma de prevenção do problema, já que as primeiras considerações quanto às medidas de prevenção devem ser de relação a evitar a transmissão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J.S. *Salmonella* en avicultura y en productos avícolas. *Avicultura Profesional*, 11(4), p. 166-172, 1994.
- BATES, C. & GRANSHAW, D. Control de la *Salmonella*: un ejemplo de trabajo. *Avicultura Profesional*, 12(4), p.164-174, 1995.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; ÁVILA, F.A.; PAULILLO, A.C.; SHOCKEN-ITURRINO, R.P.; TAVECHIO, A.T. Pesquisa de salmonelas em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. *Científica, Jaboticabal*, 11(2):165-8,1983.
- BERCHIERI, A.JR.; IRINO, K.; NEME, S.N.; et al. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. *Pesq. Vet. Bras.*, 4:83-85, 1984.
- BERCHIERI, A.JR.; PAULILLO, A.C.; FERNANDES, S.A et al. *Salmonella* em abatedouro avícola. *AQS Veterinária*, 3(1):81-87, 1987.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; ADACHI, S.Y.; CALZADA, C.T.; PAULILLO, A.C.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; TAVECHIO, A.T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, 9(1/2):9-12,1989.
- BERCHIERI, A.JR.; FERNANDES, S.A, IRINO, K.; et al. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. *Revista de Microbiologia*, 24:1, 22-25; 1993.
- BLASER, M.J. & NEWMAN, L.S. A review of human salmonellosis: I. Infective Dose. *Reviews of Infections Diseases*, 4, p.1096-1106, 1982.
- BRANGTRAKULNONT, A.; SUTHIENKUL, O.; KITJAKARA, A.; PORNRUNGWONG, S.; SIRIPANICHGON, K. First isolation of *Salmonella blockley* in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.*, 25(4), p.688-692, 1994.
- CHALKER, R.B.; BLASER, M.J. A review of Human Salmonellosis; III Magnitude of Salmonella Infection in the United States. *Rev. Infect. Disease*, 10(1), p.111-24, 1988.
- CORRIER, D.E.; NISBET, D.J.; SCANLAN, C.M.; HOLLISTER, A.G.; CALDWELL, D.J.; THOMAS, L.A.; HARGIS, B.M; TOMKINS, T.; DELOACH, J.R. Treatment of comercial broiler chickens with a characterized culture of cecal bacteria to reduce *Salmonella* colonization. *Poultry Science*, Menasha, 74, p.1093-1101, 1995.
- CORRIER, D.E.; NISBET, D.J.; HARGIS, B.M; HOLT, P.S.; DELOACH, J.R. Provision of lactose to molthing hens enhances resistance to *Salmonella*

- enteritidis* colonization. **Journal of Food Protection**, 60(1), p. 10-15, 1997.
- COSTA, F. N.; ROSSI, O.D.; TAVECHIRO, A.T. Sorotipos de *Salmonella* isolados de carcaças e cortes de frango, Jaboticabal-SP, CONFERÊNCIA APINCO, FACTA, Curitiba, p.57, 1996
- COX, N.A.; BAILEY, J.S.; BLANKENSHIP, L.C.; MEINERSMANN, R.J.; STERN, N.J.; MCHAN, F. Fifty per cent colonization dose for *Salmonella* contamination in breeder hatcheries. **Poultry Science**, Menasha, 65(4):704-9, 1986.
- ERWIN, L.E. Examination of prepared poultry feeds for the presence of *Salmonella* and other enteric organisms. **Poultry Science**, Menasha, 34: 215-6, 1955.
- ESKELUND, K. Experiencias con la bacterina de *Salmonella enteritidis*. **Avicultura Profesional**, 10(2), p. 75-83, 1992.
- FELIPE, M.R.; DEOLINDO, J.P.; MAFRA, D.; MATOS, C.H. Manipuladores de alimentos portadores de *Salmonella* spp.: Implicações na produção coletiva. **Rev. Higiene Alimentar**, 9(40): 18-19, 1995.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**, 6 th ed., A.O.A.C., 1984.
- HOFER, E; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* de aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, 17(2), p.55-62, 1997.
- ICMSF- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganismos de los alimentos: Métodos de muestreo para analisis microbiológicos - principios e aplicaciones específicas**. Zaragoza: Acribia, 1983. 431p.
- ICMSF- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganisms in food: application of the hazard analysis critical control points (HACCP) system to ensure microbiological safety and quality**. Oxford: Blackwell, 1988 a. 375 p.
- ICMSF- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Haccp in microbiological safety and quality**. Oxford: Blackwell, 1988 b. 357p.
- JONES, F.T. Controlling *Salmonella* involves the hatchery, broiler housing, litter conditions, environment, and water and feed availability. **Poultry Digest**, January, 28, p. 24-26, 1991.
- LOACH, J.R. *Salmonella* prevention with carbohydrates. **Broiler Industry**, Sea Isle City, 52191:8-10, 1989.
- LOACH, J.R.; OYOFO, B.H.; CORRIER, E.E.; KUBENA, L.F.; ZIPRIN, R.L.; NURMAN, J.O. Reduction of *Salmonella Typhimurium* concentration in broiler chickens by milk or whey. **Avian Diseases**, College Station, 34: 389-97, 1990.

- LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.K.; IRINO, K.; VEIGA, A.B.G.; MARQUES, E.K. Desenvolvimento de testes para detecção molecular e diferenciação de sorotipos de *Salmonella* para controle de plantéis e de alimentos de origem animal. In: CONFERÊNCIA APINCO, FACTA, Curitiba, p.91, 1996.
- MALMQVIST, M.; JACOBSSON, K.G.; HAGGBLOM, P.; et al. *Salmonella* isolated from animals and feedstuffs in Sweden during 1988-1992. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 36:1,21-39; 1995.
- MORISHITA, Y.; FULLER, R.; COATES, M.E. Influence of dietary lactose on the gut flora of chicks. *British Poultry Science*, Menasha, 23, p.349-59, 1982.
- MCCULLOUGH, N. B. & EISELE, C. W. Experimental human salmonellosis. IV. Pathogenicity of strains of *Salmonella pullorum* obtained from spray-dried whole egg. *Journal of Infect. Diseases*, 88(89), p. 259-265, 1951
- MORAN JÚNIOR, E.T. & BILGILI, S.F. Cecal salmonellae: influence of feed and water access on luminal entry with broilers challenged at market age. *Poultry Science*, Menasha, 68 (Supl. 1):40, 1989.
- MORISHITA, Y.; FULLER, R.; COATES, M.E. Influence of dietary lactose on the gut flora of chicks. *British Poultry Science*, Menasha, 23, p.349-59, 1982.
- SAITANU, K. & JERNGKLINCHAN, J. Isolation of *Salmonella* from poultry feed and feed ingredients in Thailand. *J. Veterinar. Malaysia*, 6:1,21-24; 1994.
- SCHNEITZ, C. & NUOTIO, L. Efficacy of different microbial preparations for controlling *Salmonella* colonisation in chicks and turkey poults by competitive exclusion. *British Poultry*, 33, 207-211, 1992.
- SILVA, E.N.; REIS, R.; OLIVEIRA, R.L.; ÁVILA, F.A. Salmonelas em farinhas de origem animal destinadas à fabricação de rações. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, 25(2), p. 169-173, 1973.
- SILVA, E.N.; HIPÓLITO, O.; SANTOS, D.S. Resistência à drogas em amostras de salmonelas isolados de galinhas e perus reprodutores. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, 4(4):143-5, 1984.
- SILVA, E.N. *Salmonella enteritidis*, em aves e saúde pública. *Rev. Higiene Alimentar*, 9(37):7-12, 1995.
- TIETJEN, M. & FUNG, D.Y.C. *Salmonella* and food safety. *Critical Reviews in Microbiol.* 21(1):53-83, 1995.
- VELDMAN, A.; VAHL, H.A.; BORGGREVE, G.J.; FULLER, D.C. A survey of incidence of *Salmonella* species and enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. *Veterinary Record*, 136:7, 169-172; 1995.

- VERDI, S.R.; TORRES, V.S.; BARBOSA, M. Análise qualitativa e quantitativa de microorganismos patogênicos em farelo de soja. In: CONFERÊNCIA APINCO, FACTA, Curitiba, p.105, 1996.
- VILLEGAS, P. Posibilidades para el control de *Salmonella*. **Avicultura Profesional**, 10(3), 123-124, 1993.

CAPÍTULO 1

AValiação MICROBIOLÓGICA DE INGREDIENTES E RAÇÕES

RESUMO

SANTOS, E. J. *Avaliação Microbiológica de Ingredientes e Rações*. Lavras: UFLA, 1998 (Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos).

A qualidade higiênico-sanitária da ração é uma medida de controle da veiculação de patógenos, já que a ração se constitui parte integrante da cadeia alimentar se estendendo do sistema de produção animal até o consumidor. Sendo de suma importância o controle microbiológico e de adulterações de rações e matérias-primas, o presente estudo objetivou avaliar a qualidade destes produtos através da pesquisa de grupos microbianos indicadores de contaminação como contagem de mesófilos, fungos, coliformes fecais e presença de *Salmonella*. Ainda para obtenção sumária da qualidade nutricional das farinhas de carne e ossos e detecção de possíveis adulterações, foi efetuada a análise de microscopia. Utilizaram-se como regra geral para as análises microbiológicas os métodos descritos pela "American Public Association" APHA, Speck, 1984. A microscopia foi realizada de acordo com a metodologia preconizada por A.A F.M., 1992. As farinhas de carne e ossos contaminadas por *Salmonella* (90%) se constituíram na principal fonte de veiculação deste patógeno para as rações (36,36%), com conseqüente disseminação para as aves. A contagem de indicadores microbianos como a enumeração de mesófilos e de fungos e leveduras computam 100% das farinhas animal e vegetal como de boa qualidade. Para a contagem de fungos e leveduras, 27,27% das rações apresentam má qualidade com contagens superiores a 10^6 UFC/g. A presença de coliformes fecais na farinha de carne e ossos (20%) e nas rações (44,45%) está associada à falta de higiene geral na manipulação e armazenamento do produto. Aspectos como a abundância de cascos/chifres (40%) e couro (60%) nas farinhas de carne e ossos demonstram serem estas alimentos com baixa digestibilidade.

Comitê Orientador: Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Orientador)

ABSTRACT

SANTOS, E. J. **Microbiology Evaluation of Feedstuffs and Rations.** Lavras; UFLA (Dissertation - Master Program in Food Science.

The hygienic quality of the ration is a control measure for the spreading of pathogens, since the ration is an integrated part of the food chain extending from the animal production system to the consumer. Being of outstanding importance the microbiologic and adulteration control of rations and raw materials the present study aimed to evaluate the quality of those products through research into microbial groups which denote contamination as a count of mesophiles, fungi, fecal coliforms and the presence of *Salmonella*. Still, for brief obtaining of nutritional quality of meat and bone meals and detection of possible adulterations, a microscopic analysis was performed. As a general rule for the microbiologic analyses the methods reported by the American Public Association-APHA, Speck, 1984 were utilized. Microscopy was achieved according to the methodology advised by AAF.M., 1992. The meat and bone meals contaminated by *Salmonella* (90%) are the chief vehicular source of this pathogen for the rations (36,36%) with consequent spread to the birds. Microbial indicator counts as the enumeration of mesophiles and fungi and yeasts accounts for 100% of the animal and plant meals of high quality. For the of fungi and yeastscount, 27.27% of the rations present poor quality with counts superior to 10⁶ (CFU/g). Presence of fecal coliforms in meat and bone meals (20%) and rations (44.45%) is associated with the lack of general hygiene in the handling and product storage. Aspects such as na abundance of hoofs/horns (40%) and hide (60%) in meat show these feeds are of poor quality.

Guidance Committee: Dr. Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A presença de salmonelas nos ingredientes de rações para aves constitui um problema, pois, embora estes organismos não causem, comumente doença em animais adultos, provocam gastroenterites/toxinfecções em pintinhos e nos consumidores de carnes e derivados contaminados (Hinton & Mead, 1992).

O controle microbiológico da farinha de carne e ossos destinados à nutrição animal é de suma importância visto que a ingestão desta matéria prima contaminada por bactérias pode ser causa de sérios problemas para os animais que as ingerem (Andriguetto et al., 1990).

A qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos depende basicamente de fatores como a extensão da contaminação da matéria prima, da contaminação do produto final e de condições de armazenamento. As características da farinha de carne e ossos fazem-na susceptível a alterações físico-químicas e deteriorização por diversas estirpes microbianas patogênicas. Este subproduto animal como mencionado pertinentemente em literatura nacional (Berchieri Júnior et al 1984; Berchieri Júnior et al 1989; Silva et al 1973) e internacional (Bangtrakulnonth et al 1994; Saitanu et al 1994; Malmqvist et al 1995) encontra-se freqüentemente contaminado por patógenos, destacando-se o gênero *Salmonella*.

As salmonelas têm seletividade para as diferentes espécies animais e apresentam variabilidade de resistência às condições ambientais. Se conseguíssemos excluir as principais fontes das salmonelas que levam a contaminação às aves, talvez, as ações seriam mais objetivas (Tauxe, 1991).

A prática empregada para produtos alimentares na determinação da qualidade higiênica dos alimentos é a determinação de organismos indicadores. Em relação aos microrganismos mais indicativos ou representativos da qualidade sanitária se destacam o grupo coliforme fecal e no caso das rações a presença de salmonelas.

A microscopia de alimentos para animais confere auxílio técnico na detecção de contaminação, fraudes e problemas decorrentes do processamento industrial, nem sempre possíveis de serem detectados por meio de análises químicas. A qualidade de farinhas de carne e ossos deve ser avaliada principalmente pela quantidade e tipos de contaminações e adulterações (A.A.F.M., 1992). Segundo o M.A. (1989) este subproduto deve ser isento de chifres, cascos e outras matérias estranhas à sua composição; sangue, pêlos; conteúdo estomacal ou ruminal são admitidos em quantidades inevitáveis nos bons métodos de processamento.

Considerando a importância do controle microbiológico e contaminações/adulterações de rações e ingredientes de rações, o presente estudo objetivou avaliar a qualidade destes produtos através da pesquisa de grupos microbianos indicadores de contaminação, presença de *Salmonella* sp e análises microscópicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As rações foram elaboradas no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras e as avaliações microscópicas no LARA/ Pedro Leopoldo, MG.

2.1 Material

2.1.1 Coleta de amostras de rações e farinhas de carne e ossos de diferentes frigoríficos

As farinhas de carne e ossos eram procedentes de dez diferentes frigoríficos do estado de Minas Gerais. Oriundas de embalagem original e lacrada, as amostras foram coletadas em frascos estéreis para análise posterior.

Efetuuou-se análise de 23 amostras envolvendo ração inicial e de crescimento para frangos de corte.

2.2 Métodos para isolamento de salmonelas

Utilizou-se como regra geral o método descrito pela Associação Americana de Saúde Pública “American Public Health Association- APHA”, (SPECK, 1984) obedecendo aos seguintes passos.

2.2.1 Pré-enriquecimento

No laboratório, as amostras devidamente codificadas e pesadas em porções de 25g foram depositadas em frascos de boca larga, contendo 225 mL de água peptonada tamponada a 1%. A incubação deste material foi realizada a 37°C, em estufa bacteriológica por 24h, como pré-enriquecimento para o isolamento inicial de salmonela.

2.2.2 Enriquecimento seletivo

Aliquotas de 1 mL de amostra pré-enriquecida eram inoculadas nos caldos tetrionato Muller Kauffmann (TMK) e Rapaport-Vassiliadis (RV) incubados a 37°C e 43°C, incubados /18-24h.

2.2.3 Plaqueamento em ágar de cultivo seletivo

Foram utilizados dois tipos de ágar: ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e o ágar Rambach (RAM). A escolha decorreu do tipo de amostras que seriam trabalhadas, altamente contaminadas por outras enterobactérias. Após o período de incubação, os tubos dos caldos TMK e RV eram levemente agitados e retirada uma alçada para plaqueamento em estrias de esgotamento nos meios seletivos. As placas foram então incubadas por 18-24h de acordo com a temperatura de incubação dos caldos delas originados, 37°C e 43°C.

2.2.4 Triagem de colônias suspeitas

As colônias que apresentavam reações indicativas de serem salmonelas nos ágar seletivos eram selecionadas e passadas, com o auxílio de alça em forma de agulha, para tubos de triagem contendo o meio de ágar tríplice açúcar e ferro (TSI) e o ágar lisina ferro (LIA). Foram retiradas em média seis colônias suspeitas de cada uma das placas de ágar seletivos. Os tubos de triagem, após a devida identificação, eram incubados por 18-24h em estufa a 37°C. Após este período, os tubos que apresentavam reações características de serem salmonelas eram selecionados para as provas bioquímicas de identificação genérica.

2.2.5 Identificação bioquímica

Foi efetuada purificação de todas as estirpes microbianas isoladas e efetuada uma rápida identificação bioquímica, utilizando-se os sistemas comerciais Bactray I e II (DIFCO) e o API 20E (BIOMerriex).

2.2.6 Análises complementares

A fim de se obter um perfil higiênico sanitário mais completo foram realizadas contagens em placa para microrganismos mesófilos ou contagem padrão em placas, contagem de bolores e leveduras, determinação do número mais provável de coliformes totais e de origem fecal (SPECK,1984) e exclusivamente para as farinhas de carne e ossos foi realizada análise de microscopia (A.A.F.M.,1992).

Foram tomados 10 g de cada amostra, feitas diluições em 90 mL de água peptonada 0.1% e da diluição inicial foram feitas diluições subsequentes.

A contagem em placa para microorganismos mesófilos foi realizada utilizando-se ágar para métodos padronizados ou “plate count ágar” (PCA), incubando-se a 32 °C durante 48 horas. Para a contagem de bolores e leveduras foi usado o meio ágar batata-glicose acidificado com ácido tartárico a 10% até pH 3.5, incubando-se a 25°C por 3 a 5 dias.

O teste presuntivo para coliformes de origem fecal foi feito em uma série de 3 tubos com caldo lauril sulfato triptose, incubando-se a 35 °C durante 48 horas. Das amostras com turvação e produção de gás foi feito o teste confirmativo em caldo EC a 44,5°C por 48 horas.

Os resultados obtidos foram comparados às normas microbiológicas para rações padronizadas para a Holanda e citadas por Andriguetto et al (1990) conforme tabela 1.

TABELA 1 - Normas microbiológicas para rações fareladas

Indicativo	Bom	Aceitável	Inaceitável
Contagem mesófilos	< 10 ⁶	10 ⁷	> 10 ⁸
Enterobactérias/g	< 10 ⁴	10 ⁴ a 10 ⁵	> 10 ⁶
Fungos/g	< 10 ⁴	10 ⁴ a 10 ⁵	> 10 ⁶
<i>E. coli</i> em 0,1 g	Ausente	Presente	presente
<i>Salmonella</i> em 25g	Ausente	Ausente	presente

Dados adaptado de Andriguetto et al, 1990

As análises de microscopia foram realizadas de acordo com A.A.F.M., 1992.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise microbiológica

Os resultados das análises microbiológicas de rações e matérias-primas estão registrados nas tabelas 2, 3 e 4.

A contagem de mesófilos ou contagem padrão em placas efetuadas nas amostras de farinhas de origem animal e vegetal está apresentada na tabela 2. Conforme os critérios citados por Andriguetto et al. (1990) 100% das amostras de farinhas são consideradas de boa qualidade. Apesar deste critério não ser muito eficiente como indicador microbiano com relação à presença de patógenos, ele mostra superficialmente o grau de contaminação da matéria-prima (ICMSF, 1983).

A contagem de bolores e leveduras apresentada também nas tabelas 3 e 4 conferem a 27,27% das rações má qualidade se comparados aos dados relatados por Andriguetto et al. (1990). A presença de bolores indica que a Aw das farinhas de carne permite o crescimento de bolores e leveduras ou as rações foram armazenadas em condições inadequadas de umidade relativa e temperatura. A presença de fungos é indesejável, pois os mesmos quando presentes, poderão produzir micotoxinas (ICMSF, 1983).

Coliformes de origem fecal foram encontrados em 2 amostras das farinhas de carne e ossos (tabela 2). De acordo com os critérios citados por Andriguetto et al. (1990), 80% das amostras das farinhas de carnes e ossos e também as amostras de farelo de soja e de milho apresentaram-se em boas condições em relação a este indicador. A presença de *E. coli* nas farinhas de carne e ossos pode estar indicando uma falta geral de higiene na manipulação e

armazenamento da mesma (ICMSF, 1983). A ocorrência de coliformes fecais foi encontrada em índice 44,45% das rações conforme pode ser observado nas tabelas 3 e 4. Estes microrganismos presentes, tanto na matéria-prima como em rações podem desencadear a ingestão de outros patógenos pelas aves.

As farinhas de origem animal são constantemente mencionadas na literatura como a principal fonte de transmissão de salmonelas para rações e conseqüentemente para as aves. Elas se contaminam geralmente após a saída dos digestores, por falha ou contaminação cruzada entre a planta de abate e graxaria. Estas duas áreas deveriam ser isoladas, tanto pessoal como em equipamento. Alguns abatedouros modernos já possuem este cuidado.

TABELA 2 - Avaliação do perfil higiênico sanitário dos ingredientes da ração

Amostras	Cont. mesófilos	Cont. fungos e leveduras	Cont. de coli-formes (NMP)	<i>Salmonella</i>
FCO 1	B	B	< 3	Presente
FCO 2	B	B	0,9	Presente
FCO 3	B	B	<3	Presente
FCO 4	B	B	<3	Presente
FCO 5	B	B	>140	Presente
FCO 6	B	B	<3	Ausente
FCO 7	B	B	<3	Presente
FCO 8	B	B	<3	Presente
FCO 9	B	B	<3	Presente
FCO 10	B	B	<3	Presente
FAMI	B	B	Ausente	Ausente
FASO	B	B	Ausente	Ausente

FCO= Farinha de carne e ossos, FAMI= Farelo de milho, FASO= Farelo de soja

B= Bom < 10⁶; A= Aceitável 10⁷; I=Inaceitável > 10⁸

TABELA 3 - Avaliação microbiológica de rações iniciais

Amostras	Contagem de mesófilo	Contagem de fungos	Contagem de coliformes fecais (NMP/g)	<i>Salmonella</i>
R (controle)	< 10 ⁶	1,38 X 10 ⁸	0,4	presente
RA	< 10 ⁶	<10 ³	Ausente	ausente
RB	< 10 ⁶	<10 ³	Ausente	ausente
RC	< 10 ⁶	6,5 X 10 ⁷	0,4	ausente
RD	< 10 ⁶	3,95 X 10 ⁷	Ausente	presente
RE	< 10 ⁶	4,65 X 10 ⁷	Ausente	ausente

Ração controle = Ração elaborada sem farinha de origem animal em sua formulação. RA= Ração elaborada sem farinha de carne e ossos (FCO) 3; RB= Ração elaborada com FCO* 8; RC= Ração elaborada com FCO* 2; RD=Ração elaborada com FCO* 7; RE= Ração elaborada com FCO* 9. *As FCO utilizadas são as citadas na tabela 2.

TABELA 4 - Avaliação microbiológica de rações para crescimento

Amostras	Cont. mesófilo	Cont. fungos	Cont. coliformes (NMP/g)	<i>Salmonella</i>
RA'	<10 ⁶	<10 ³	25	presente
RB'	<10 ⁶	<10 ³	3	ausente
RC'	<10 ⁶	<10 ³	2,5	presente
RD'	<10 ⁶	<10 ³	Ausente	ausente
RE'	<10 ⁶	<10 ³	Ausente	ausente

FCO= farinha de carne e ossos. RA'= Ração elaborada sem farinha de carne e ossos (FCO) 3; RB'= Ração elaborada com FCO* 8; RC'= Ração elaborada com FCO* 2; RD'=Ração elaborada com FCO* 7; RE'= Ração elaborada com FCO* 9. *As FCO utilizadas são as citadas na tabela 2.

Evidências experimentais, publicadas com envolvimento de *Salmonella* em farinhas de origem animal, variam em níveis de 5 a 96,67% (Giorgi et al, 1971; Silva et al, 1973; Berchieri Júnior, 1983, 1984, 1986, 1989; Miranda et al, 1978; Girão et al, 1983; Prestes et al, 1983; Saitanu & Jerngklinchan, 1994, Veldman, 1995; Bosquiroli, 1996).

Em levantamento epidemiológico recente (Bosquiroli, 1996) foi marcante a presença de salmonelas em farinhas de carne (mais de 181 cepas), seguidos de farinhas de pena (mais de 87 cepas) e farinhas de vísceras (mais de 80 cepas). As rações de matrizes e frangos preparados com estas matérias-primas tinham seis do total de 24 sorotipos isolados das matérias-primas, sendo que um deles estava na ração de frangos mas não nas matérias primas examinadas. O único sorotipo isolado de ovos bicados foi, também, isolado da farinha de carne.

Conforme pode ser observado na tabela 02 neste estudo 90% das amostras de farinhas de carne e ossos apresentaram contaminação por *Salmonella*. Já as rações se mostraram contaminadas por *Salmonella* em índice de 36,36 % de acordo com tabelas 3 e 4.

Apesar de a grande incidência de contaminação da ração ocorrer através de ingredientes de origem animal, como farinha de carne, farinha de ossos, farinha de pena e vísceras, já foi constatada a possibilidade de contaminação através de produtos de origem vegetal, presentes nos trabalhos de Veldman (1995) e Verdi (1996). Nesta pesquisa provavelmente as fontes de contaminação das rações foram as farinhas de origem animal.

A simples utilização de ração isenta de *Salmonella* sp não significa ausência de infecção nas aves, mas este procedimento é uma importante etapa para sua redução, sendo necessária que estas medidas sejam instituídas primeiro para que, posteriormente, outros segmentos do ciclo de produção aviária sejam alterados para evitar a transmissão ou propagação da infecção. De acordo com

Berchieri Júnior et al (1989) a detecção de *Salmonella* na ração é mais difícil, porque ocorre uma diluição das matérias primas de origem animal. Todavia, uma célula bacteriana apenas, se ingerida pela ave, tem condições de se multiplicar e promover a colonização dos cecos, transformando a ave em um agente de disseminação ou introduzindo o paratifo. Na presente pesquisa foram isoladas *Salmonella* de quatro rações, sendo que uma destas não continha farinha de origem animal em sua formulação. A contaminação desta amostra de ração pode ser explicada através da contaminação da fábrica de ração ou do ambiente avícola.

Um dos fatores essenciais para impedir a disseminação de *Salmonella* no ambiente avícola é que seja utilizada apenas ração peletizada ou ração farelada com tratamento térmico (McIlroy et al, 1991). No trabalho de Veldman et al (1995), para a ração farelada foi encontrado um índice de contaminação por salmonela de 21% e, em produtos peletizados, o índice caiu para 1,4%. Ainda, no mesmo trabalho a temperatura utilizada para a peletização é abordada como ponto chave na descontaminação já que de 60°C a 75°C foram encontradas amostras ainda positivas para *Salmonella*. Também é imprescindível que os subprodutos de origem animal, quando adicionados, sejam livres de salmonelas.

A presença de *Salmonella* em ingredientes e rações é indesejável uma vez que pode acarretar contaminação cruzada durante o abate pelo contato da carcaça de frango com as penas ou com o conteúdo intestinal.

3.2 Avaliação Microscópica

A microscopia auxiliou no controle de qualidade dos ingredientes das rações. O fornecimento de dados auxiliares do sistema de processamento da matéria-prima subsidia a avaliação da qualidade e o valor nutricional destes

alimentos. Segundo Bonetto (s/d), além de fornecer dados que não seriam possíveis através da análise química, é um método rápido, barato, dispensa equipamentos de alto custo e deve ser considerado o instrumento número um, onde determinadas análises químicas são limitadas.

Aproximadamente 90-95% dos problemas potenciais com o alimento podem ser detectados no momento do recebimento com o emprego da microscopia (Bates, 1994).

Conforme a tabela 5, aspectos como a presença de pelos (20%), fâneros (cascos/chifres, 40%) e couro/colágeno (60%) nas farinhas de carne e ossos são abordados como prejudiciais à qualidade nutricional, normalmente não detectados nas análises de rotina e constituem fontes protéicas de baixo valor biológico.

Os contaminantes indicam falhas no processamento, mesmo sendo encontrados em quantidades de escassez como plástico, sangue, fibra vegetal semi-digerida, partícula metálica, pena, partícula super aquecida e víscera.

Nos constituintes de origem vegetal não foram encontradas adulterações.

TABELA 5 - Análise de microscopia de ingredientes das rações

Amostras	Elementos de Análise (farinhas de carne e ossos)			
	Pelos	Couro/ colágeno	Fâneros	
FCO 1	++	+++	++	Plástico (+)
FCO 2	++	++	+	Ausente
FCO 3	++	++	+	Sangue (+)
FCO 4	+++	+++	+++	Fibra vegetal semi-digerida (+)
FCO 5	+	++	++	Fibra vegetal semi-digerida (+)
FCO 6	+	+++	++	Sangue (+)
FCO 7	++	+++		Fibra vegetal semi-digerida (+)
				Partícula super aquecida (++)
FCO 8	+	++		Fibra vegetal semi-digerida (+)
				Plástico(+)
				Partícula metálica(+)
FCO 9	+	+++		Víscera (+)
FCO 10	+++	+++		Fibra vegetal semi-digerida (+)
				Pena (+)
				Sangue (+)
Amostras	Elementos de análise (farelo vegetal)			
Farelo de milho				Sem adulterações
Farelo de soja				Sem adulterações

(+)=escasso; (++)=moderado; (+++) abundante; (++++)= campo repleto
 FCO= farinha de carne e ossos.

4 CONCLUSÕES

As farinhas de carne e ossos contaminadas por *Salmonella* se constituíram na principal fonte de veiculação deste patógeno para as rações. As contagens de mesófilos e de bolores e leveduras não se mostraram indicadores eficazes já que as mesmas computam 100% das farinhas (animal e vegetal) como de boa qualidade. A presença de coliformes fecais nas rações e matéria-prima indica a falta de higiene geral na manipulação e armazenamento de produtos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN ASSOCIATION OF FEED MICROSCOPISTS (AAFM). **Manual of microscopic analysis of feedstuffs**. 3ed., 1992. 211 p.
- ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; et al. **As bases e os fundamentos da nutrição animal**. 4 ed. São Paulo: Nobel, 1990. 396 p.
- BATES, L.S. Microscopia de alimentos: segredos para um rápido controle de qualidade. **Avicultura Profissional**, 11: 4, 1994.
- BERCHIERI, JR. A; ÁVILA, F.A; PAULILLO, AC.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MARQUES, M., A.S. & MATSUDA, H.J. Pesquisa de salmonelas em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. **Científica, Botucatu**, 11:165-168, 1983.
- BERCHIERI JR. A; IRINO, K.; NEME, S.N.; PAULILLO, A.C.; CALZADA, C.T.; FERREIRA, S.A & PESSOA, G.V.A. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. **Pesq. Vet. Bras.**, 4:83-85, 1984.
- BERCHIERI JR., A.; IRINO, K.; PAULILLO, A.C.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; KRONKA, S.N. & PESSOA, G.V.A. Pré-enriquecimento direto na pesquisa de *Salmonella* em farinha de carne. **Pesq. Vet. Bras.** 6: 93-97 p., 1986.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; ADACHI, S.Y.; CALZADA, C.T.; PAULILLO, A.C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; TAVECHIO, A.T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, 9(1/2):9-12, 1989.
- BONETTO, J.E.C. **Microscopia de ingredientes e rações**. Campinas: FACTA, s/d. 50p.
- BOSQUIROLI, S.L. **Estudo epidemiológico da ocorrência de *Salmonella* em uma integração de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) -Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp 1996.
- BRANGTRAKULNONTH, A.; SUTHIENKUL, O.; KITJAKARA, A.; PORNRUNGWONG, S.; SIRIPANICHGON, K. First isolation of *Salmonella blockley* in Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.**, 25(4), p.688-692, 1994.
- COSTA, F.N.; ROSSI, O.D.; TAVECHIRO, A.T. Sorotipos de *Salmonella* isolados de carcaças e cortes de frango, Jaboticabal-SP, In: CONFERÊNCIA APINCO, FACTA, Curitiba, p.57, 1996.

- GIORGI, W.; OHASHI, K. & ARAUJO, W.P. Farinha de carne e farinha de peixe como fontes de salmonelas para animais. *Arqs. Inst. Biol.*, São Paulo, 38: 59-62 p., 1971.
- GIRÃO, F.G.F.; OLIVEIRA, R.L.; FERREIRA, H.B.C.; NOGUEIRA, R.U.G. Isolamento de salmonela a partir de amostras de matérias-primas e rações e de materiais provenientes de aves. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA; CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 8., CAMBORIÚ, 1983. *Anais. Camboriú, UBA*, 1983. V.2, p.469-476.
- HINTON, M.& MEAD, G.C. Bacterial pathogens in animal feed and their control. *World's Poultry Science Journal*, London, 48:72-3, 1992.
- ICMSF- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Microorganismos de los alimentos: técnicas de analisis microbiológico*. Zaragoza: Acribia, 1981. 215 p.
- MALMQVIST, M.; JACOBSSON, K.G.; HAGGBLOM, P. et al. *Salmonella* isolated from animals and feedstuffs in Sweden during 1988-1992. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 36:1,21-39; 1995.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. *Padrões oficiais de matérias primas destinadas à alimentação animal*. Brasília: Ministério da Agricultura, 1989. 40p.
- MIRANDA, J., B., N. ; PESSOA, G., V.A. ; IRINO, K. & CALZADA, C.T. Ocorrência de *Salmonella* em farinhas utilizadas como matérias-primas na composição de rações animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 32: 157-160 p., 1978.
- PRESTES, A.A; SILVA, E.N.; ITO, N.M.K.; JORGE, M. & HIPÓLITO, O. Salmonelas em matérias primas de origem animal destinadas à fabricação de rações. In: ANAIS VIII CONG. BRAS. AVICULTURA, Camboriú, 440-446 p.1983.
- SAITANU, K. & JERNGKLINCHAN, J. Isolation of *Salmonella* from poultry feed and feed ingredients in Thailand. *J. Veterinar. Malaysia*, 6:1,21-24; 1994.
- SILVA, E.N.; REIS, R.; OLIVEIRA, R.L.; ÁVILA, F.A. Salmonelas em farinhas de origem animal destinadas à fabricação de rações. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, 25(2), p. 169-173, 1973.
- SPECK, M.L. *Compedium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Washington: APHA/Technical Committee on Microbiological for Foods. 1984. 914 p.

- TAUXE, R.V. *Salmonella*: A postmodern pathogen. **J. Food Protect.**, 54: 563-569, 1991.
- VELDMAN, A.; VAHL, H.A.; BORGGREVE, G.J.; FULLER, D.C. A survey of incidence of *Salmonella* species and enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. **Veterinary Record**, 136:7, 169-172; 1995.
- VERDI, S.R.; TORRES, V.S.; BARBOSA, M. Análise qualitativa e quantitativa de microorganismos patogênicos em farelo de soja. In: CONFERÊNCIA APINCO, FACTA, Curitiba, p.105, 1996.
- VILLEGAS, P. Posibilidades para el control de *Salmonella*. **Avicultura Profesional**, 10(3), 123-124, 1993.

CAPÍTULO 2

RASTREAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE SOROVARES DE *Salmonella* EM FRANGOS DE CORTE A PARTIR DE ALIMENTO NATURALMENTE CONTAMINADO

RESUMO

SANTOS, E. J. Rastreamento Epidemiológico de Sorovares de *Salmonella* em Frangos de Corte a Partir de Alimento Naturalmente Contaminado. Lavras: UFLA (Dissertação - Mestrado em Ciência de Alimentos)

As aves se infectam por via oral e seu alimento constitui um importante veículo de contaminação. A caracterização antigênica das salmonelas constitui um importante instrumento de vigilância epidemiológica, permitindo a identificação de sorovares de *Salmonella* circulantes no ambiente avícola. Nesse sentido o presente trabalho se ateve a um estabelecimento de ligação convincente entre a infecção de um lote de aves e o consumo de ração contaminada. Foram estudadas 57 amostras, compreendidas em farinhas de carne e ossos (10), farelo de soja (1), farelo de milho (1), rações (11), suabe cloacal (11), vesícula biliar (11) e intestino (11). As amostras da vesícula biliar e intestino originaram de 33 aves coletadas de acordo com sua alimentação. Para o enriquecimento seletivo foram utilizados os cáldos Tetrionato Miller-Kauffman e Rappaport - Vassiliadis e na etapa de cultivo seletivo o ágar Rambach e SS (*Salmonella-Shigela*) a 37 °C e 43 °C. As estirpes bacterianas suspeitas foram identificadas pelos sistemas comerciais API 20E e Bac Tray (I e II) e, posteriormente, enviadas para sorotipagem no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz. Foram encontrados nos alimentos das aves os sorotipos *S. Senftenberg*, *S. Infantis*, *S. Give*, e *S. Fyris*. Nas aves os sorovares presentes se ativeram a *S. Infantis*, *S. Bredeney*, *S. Senftenberg* e *S. Give*, sendo que em 72,73% grupos de aves, houve relação restrita entre os sorovares identificados no alimento com as respectivas aves.

Comitê Orientador: Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho -UFLA (Orientadora)

ABSTRACT

SANTOS, E. J. Epidemiological Tracking of Serovars of *Salmonella* in Broiler Chickens. Lavras: UFLA (Dissertation - Master Program in Food Science)

Chicken infect themselves by orally and their feed constitutes an important contamination vehicle. The antigenic characterization of *Salmonella* is an important epidemiological vigilance tool, enabling the identification of serovars of *Salmonella* circulating in avian setting. In this sense, the present work focused on the establishment of a convincing link between the infection of a group of birds and the intake of contaminated ration. Fittyseven samples which consisted of meat and bone meals (10), soybean meal (1), corn meal (1), rations (11), cloacal swab (11), bile vesicle (11) and intestine (11) were studied. The samples of bile vesicle and intestine originated from 33 birds collected according to their feeding. For the selective enrichment the Tetrionate Muller Kaufman and Rappaport-Vassiliadis broths and at the selective cultivation step, the Rambach and SS (*Salmonella-Shigela*) agar at 37°C and 43°C were utilized. The suspected bacterial strains were identified by the commercial systems API 20 E and Bac Tray (I and II) and later sent for serotyping to the Bacterial Zoonosis Laboratory of Fundação Oswaldo Cruz. In the feeds of the birds the following serovars were found: *S. Senftenberg*, *S. Infantis*, *S. Give* and *S. Fyris*. In 72.73 % at the groups of birds, there was a close relationship between the serovars found in the feeds or feedstuffs and the respective bird.

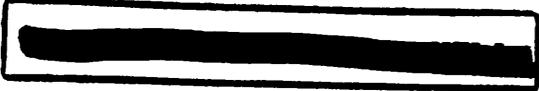
Guidance Committee: Dr. Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

1 INTRODUÇÃO

Na criação de aves e também em seu habitat natural, a não colonização do trato gastrointestinal por *Salmonella* sp é extremamente rara, devido às inúmeras fontes de contaminação e ao fato desta bactéria geralmente não afetar clinicamente aves saudáveis. (Hofer, 1997). Assim sendo, ocorre geralmente uma omissão da presença de portadoras assintomáticas no plantel de alguns fornecedores ou em produtos avícolas aparentemente inócuos, como a presença deste patógeno em aves destinadas ao consumo humano relatado por Costa et al, 1996.

Segundo Irwin et al (1994), as aves se infectam provavelmente durante as duas primeiras semanas de vida. O grau de suscetibilidade das aves às salmonelas é um fato evidente. Considerando a infecção nos primeiros dias de vida, a excreção fecal da bactéria ocorrerá em grande quantidade e por tempo mais prolongado que nas aves infectadas mais tardiamente. Ao 10^o mês de vida das aves, os sinais clínicos da doença são raros, quando não houver condições adversas ou estressantes que os permitam (Bailey 1994).

As espécies hospedeiro específicas das aves são *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, ambas imóveis, agentes causadores da pulorose e tifo aviário, respectivamente. As demais espécies de *Salmonella* poderão determinar patologia clínica nas aves ou apenas colonizá-las e estão agrupadas em infecções paratífoides, cuja característica comum é a mobilidade destas espécies, devido à presença de flagelo. As formas entéricas crônicas determinadas por salmonelas móveis são comuns, enquanto formas agudas ou septicêmicas. Somente ocorrem em aves jovens ou aves adultas, sob condições estressantes como outras doenças bacterianas, virais, dieta e ou manejo inadequados (Barrow 1993, Bailey 1994).



O grande enigma desta zoonose reside então na sua forma inaparente e rotulada em patologia aviária, como infecções paratíficas, que não estimulam mecanismos efetivos de eliminação. Além disso, as salmonelas paratíficas irão, assim, permanecer no trato digestivo das aves, transformando-se em possíveis fontes de toxinfecções alimentares em saúde pública, via produtos de origem animal.

Com o objetivo de pesquisar a colonização por *Salmonella* sp em frangos de corte, que receberam alimento naturalmente contaminado por este patógeno, foram efetuadas amostragens para análises de cloaca de pintos de 10 dias e após 45 dias, análise do intestino e vesícula biliar de frangos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

2.1 Material

2.1.2 Coleta de amostras de rações e farinhas de carnes e ossos de diferentes frigoríficos

As farinhas de carne e ossos foram originadas de dez diferentes frigoríficos da região de Minas Gerais. Oriundas de embalagem original e lacrada, as amostras foram coletadas em frascos estéreis para posterior análise.

As rações foram preparadas na fábrica de rações do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras.

2.1.3 Coleta de material da cloaca dos pintinhos

Foram pesquisados, quanto à presença de *Salmonella*, 11 amostras de suabe cloacal destas aves, sendo estas amostras representativas de aves alimentadas com rações confeccionadas por 5 diferentes frigoríficos. A dieta das aves foi diferenciada em grupos que iniciaram a ração formulada com farinha de carne e ossos em pintos de 1 dia e outros de sete dias, havendo também um grupo controle alimentado com ração sem adição de farinha de origem animal.

As amostras foram coletadas através da introdução de um suabe esterilizado na cloaca de cada pintinho e em seguida colocado em um tubo de ensaio, contendo 10 mL de água peptonada tamponada e levadas ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

2.1.4 Coleta de material da vesícula biliar e intestino das aves

A fim de investigar a presença de *Salmonella* sp no trato gástrico intestinal, as aves no 45º dia de vida foram submetidas ao abate e em condições assépticas foi realizada uma incisão do abdômen de 33 aves. As análises microbiológicas seguiram os padrões sugeridos por Nascimento (1996) com algumas modificações.

Foram retiradas porções do intestino grosso e, em conjunto, um “pool” de fígado e vesícula biliar, para cada tratamento segundo tabela 1. O material corretamente identificado foi colocado em placas de petri esterilizadas e depois pesados 2g assepticamente e, subsequentemente, diluído em 20 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) para posterior análise.

2.2 Métodos e procedimentos para o isolamento de *Salmonella*

Utilizou-se, como regra geral, o método descrito pela Associação Americana de Saúde Pública “American Public Health Association- APHA”, (SPECK, 1984) e as sugestões de Nascimento (1996) com algumas modificações.

2.2.1 Pré-enriquecimento de rações e matérias-primas

No laboratório as amostras devidamente codificadas e pesadas em porções de 25g foram depositadas em frascos de boca larga contendo 225 ml de água peptonada tamponada a 1%. A incubação deste material foi realizada a 37°C em estufa bacteriológica por 24h, como pré-enriquecimento para o isolamento inicial de salmonela.

2.2.2 Enriquecimento em caldos seletivos

Após a coleta o material era semeado nos caldos de enriquecimento seletivos. Aliquotas de 1 mL do pré-enriquecimento, do caldo BHI (orgãos diluídos) ou do suabe da cloaca, submergido em água peptonada, eram inoculados nos caldos tetrionato Muller Kauffmann (TMK) e Rapaport-Vassiliadis (RV) nas temperaturas de 37°C e 43°C, incubados por 18-24h.

2.2.3 Plaqueamento seletivo

Na etapa de plaqueamento seletivo, foram utilizados o ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e o ágar Rambach (RAM). A escolha decorreu do tipo de amostras que seriam trabalhadas, altamente contaminadas por outras enterobactérias. Após o período de incubação, os tubos dos caldos TMK e RV eram levemente agitados e retirada uma alçada para plaqueamento em estrias de esgotamento nas placas de petri contendo os ágar seletivos. As placas eram então incubadas por 18-24h de acordo com a temperatura de incubação dos caldos delas originados, 37°C e 43°C.

2.2.4 Triagem bioquímica e identificação bioquímica

As colônias que apresentavam reações indicativas de serem salmonelas nos ágar seletivos eram selecionadas e passadas, com o auxílio de alça em forma de agulha, para tubos de triagem contendo o meio de ágar tríplice açúcar e ferro (TSI) e o ágar lisina ferro (LIA). A inoculação era feita através de picada central e estriamento sobre superfície inclinada. Procurava-se retirar até seis colônias suspeitas de cada uma das placas de ágar seletivos. Os tubos de triagem, após a devida identificação, eram incubados por 18-24h em estufa a 37°C. Após este período, os tubos que apresentavam reações características de serem salmonelas eram selecionados para as provas bioquímicas de identificação genérica.

Objetivando uma rápida identificação bioquímica foram utilizados os sistemas comerciais Bactray I e II (DIFCO) e o API 20E (BIOMerriex).

2.2.5 Sorotipagem

As cepas caracterizadas bioquimicamente como *Salmonella* sp foram identificadas, repicadas em frascos de vidro contendo ágar nutriente, fechados com tampa de borracha e lacre de alumínio e armazenadas em geladeira para posterior envio ao Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro para a identificação sorológica e tipificação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Salmonelas em rações e matérias primas de origem animal

As farinhas de origem animal são mencionadas na literatura como excelentes veículos de disseminação de salmonelas para rações e conseqüentemente para as aves. A maioria das citações contidas na literatura relatam a presença de *Salmonella* nas farinhas de origem animal em níveis variáveis de 5 a 96,67% (Giorgi et al, 1971; Silva et al, 1973; Berchieri Júnior, 1983, 1984, 1986, 1989; Miranda et al, 1978; Girão et al, 1983; Prestes et al, 1983; Saitanu & Jerngklinchan, 1994, Veldman, 1995). Conforme pode ser observado na tabela 01 deste estudo, 90% das amostras de farinhas de carne e ossos apresentaram contaminação por *Salmonella*.

Dentre os sorotipos isolados, *S. Senftenberg* é o mais freqüente, presente em 80% das amostras. Podemos averiguar no trabalho de Hofer et al (1997) que este sorovar é classificado segundo nível de ocorrência em aves como freqüente, o que indica que podemos ter uma relação de índice de frequência do sorotipo em aves e presença deste sorotipos em fonte alimentar. Em quatro amostras se verificou-se uma contaminação de três ou mais sorotipos, revelando serem estas farinhas de péssima qualidade microbiológica. Observou-se a ocorrência também dos sorovares *S. Fyris*, *S. Give* e *S. Infantis*, sendo que este último é classificado por Hofer et al 1997, como um sorovar muito freqüente no período de 1982 a 1991 em aves.

TABELA 1 - Sorotipos de *Salmonella* em farinhas de carne e ossos de diferentes frigoríficos

Farinhas	Nº de isolamentos	Sorotipos
A	07	<i>S. Senftenberg</i>
B	08	<i>S. Senftenberg</i>
C	06	<i>S. Senftenberg</i>
D	04	<i>S. Senftenberg</i>
	01	<i>S. Infantis</i>
	01	<i>S. Give</i>
E	03	<i>S. Senftenberg</i>
F		
G	06	<i>S. Give</i>
	01	<i>S. Senftenberg</i>
	02	<i>S. Infantis</i>
H	02	<i>S. Fyris</i>
	07	<i>S. Give</i>
	01	<i>S. Senftenberg</i>
	01	<i>S. Infantis</i>
I	05	<i>S. Infantis</i>
	03	<i>S. Give</i>
	01	<i>S. Senftenberg</i>
J	02	<i>S. Give</i>
	05	<i>S. Infantis</i>
Total	66	<i>S. Fyris</i>
		<i>S. Give</i>
		<i>S. Senftenberg</i>
		<i>S. Infantis</i>

Na presente pesquisa foram isoladas *Salmonella* de quatro rações (tabela 2), sendo que uma destas não continha farinha de origem animal em sua formulação. A contaminação desta amostra de ração pode ser explicada através da contaminação da fábrica de ração ou do ambiente. De onze amostras

analisadas (36,36%), apenas quatro amostras foram positivas para salmonelas. Os sorotipos encontrados nas rações foram *S. Infantis* e *S. Senftenberg* e, com muita probabilidade, a causa da veiculação de salmonelas na ração são as farinhas de origem animal que entraram em sua formulação; até mesmo a ração controle, efetuada sem a adição de farinha de origem animal estava contaminada, provavelmente pela contaminação do ambiente. Diversos fatores contribuem para o aumento da contaminação cruzada no ambiente avícola, dentre eles podemos citar a umidade, tempo e temperatura de armazenamento, transporte, monitoramento pessoal.

Berchieri Júnior et al (1992) analisando amostras de rações originadas de quatro fábricas, encontraram 10% contaminadas por *Salmonella*.

Salienta-se assim a ocorrência da distribuição deste patógeno por todo o ambiente avícola, tendo como importante ponto inicial as matérias-primas e rações. Segundo Bates & Grandshaw (1995) e McIlroy, Neill & McCracken (1991), para a erradicação das salmonelas de ambientes avícolas uma importante medida é a utilização da peletização ou tratamento térmico da ração e que os subprodutos de origem animal quando adicionados sejam livres de salmonelas.

A simples utilização de ração isenta de *Salmonella* sp não significa ausência de infecção nas aves, mas este procedimento é uma importante etapa para sua redução, sendo necessária que estas medidas sejam instituídas primeiro para que, posteriormente, outros segmentos do ciclo de produção aviária sejam alterados para evitar a transmissão ou propagação da infecção. De acordo com Berchieri Júnior et al (1989) a detecção de *Salmonella* na ração é mais difícil, porque ocorre uma diluição das matérias primas de origem animal. Todavia, uma célula bacteriana apenas, se ingerida pela ave, tem condições de se multiplicar e promover a colonização dos cecos transformando a ave em um agente de disseminação ou introduzindo o paratifo.

TABELA 2 - Sorotipos de *Salmonella* presentes em rações para frango de corte

Amostras	Nº de isolamentos	Sorotipos
Ração inicial (com farinha de carne e ossos)	01	<i>S. Infantis</i>
Ração de crescimento (com farinha de carne e ossos)	02	<i>S. Infantis</i> <i>S. Senftenberg</i>
Ração de crescimentos (sem adição de farinha de origem animal)	01	<i>S. Infantis</i>

Em levantamento epidemiológico recente (Bosquioli, 1996), rações de matrizes e frangos alimentados com matérias-primas contaminadas tinham seis do total de 24 sorotipos isolados das matéria-primas, sendo que um deles estava na ração de frangos mas não nas matérias primas examinadas. O único sorotipo isolado de ovos bicados foi também, isolado da farinha de carne.

3.2 Sorovares de *Salmonella* nas aves e associação com o grupo alimentar

De acordo com Silva (1995), nenhuma ligação convincente tem sido estabelecida entre a infecção de um lote de aves e o consumo de ração contaminada. Assim, a presente pesquisa elucida alguns pontos determinantes na

infecção de aves através de ração contaminada como pode ser observado na tabela 3.

TABELA 3 - Sorovares de *Salmonella* presentes nas aves e em seu respectivo alimento

Grupos de aves	Fonte alimentar		Sítios de contaminação das aves		
	Farinhas de carne e ossos	Rações	Cloaca	Vesícula biliar	Intestino
A	<i>S. Senftenberg</i>				
B	<i>S. Senftenberg</i>				
C	<i>S. Infantis</i> ; <i>S. Senftenberg</i> ; <i>S. Give</i>				<i>S. Infantis</i> , <i>S. Bredeney</i>
D	<i>S. Infantis</i> ; <i>S. Senftenberg</i> ; <i>S. Give</i>				<i>S. Infantis</i> , <i>S. Senftenberg</i>
E	<i>S. Senftenberg</i>	<i>S. Infantis</i>			
F	<i>S. Senftenberg</i>	<i>S. Infantis</i>			<i>S. Infantis</i>
G	<i>S. Infantis</i> ; <i>S. Senftenberg</i> ; <i>S. Give</i> ; <i>S. Fyris</i>		<i>S. Senftenberg</i> <i>S. Give</i> ; <i>S. Bredeney</i>		
H	<i>S. Infantis</i> ; <i>S. Senftenberg</i> ; <i>S. Give</i> ; <i>S. Fyris</i>				
I	<i>S. Infantis</i> ; <i>S. Give</i> ; <i>S. Senftenberg</i>				
J	<i>S. Infantis</i> ; <i>S. Give</i> ; <i>S. Senftenberg</i>	<i>S. Infantis</i>			
*Controle		<i>S. Infantis</i>		<i>S. Infantis</i>	<i>S. Infantis</i>

*Ração sem adição de farinhas de origem animal.

Ao décimo dia de vida, a análise da cloaca indicou apenas um grupo contaminado, o que não significa que os outros grupos não apresentaram contaminação, pois até mesmo a diarreia ocorreu para todos os grupos das aves.

Os sorotipos encontrados no grupo G correspondem aos presentes na alimentação e comprovam a relação restrita entre a fonte alimentar e a infecção das aves. O sorovar *S. Bredeney* aparece somente na cloaca deste grupo e no intestino de outro grupo, podendo demonstrar então que este sorotipo esteja veiculado através da compra de aves já infectadas ou de contaminação ambiental como vindos de roedores, pássaros, insetos, procedimentos de manejo, etc.

No grupo controle temos a ração contaminada pelo sorovar *S. Infantis*, comprovando a disseminação deste patógeno através da vesícula biliar e do intestino. Em geral, para os cinco grupos (45,45%) onde foi constatada a presença de *Salmonella*, os sorotipos presentes obedeceram a uma relação restrita com os encontrados na sua fonte alimentar.

4 CONCLUSÕES

Os sorotipos isolados nas rações foram também isolados nas farinhas, demonstrando que a fábrica de rações é um importante ponto crítico da disseminação da *Salmonella*.

Os sorovares *S. Infantis*, *S. Senftenberg* e *S. Give* presentes em sítios de contaminação das aves também foram identificados nas fontes alimentares distintas. De acordo com as evidências, a ingestão de alimento contaminado está relacionada como fator crucial na disseminação dos sorovares de *Salmonella*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J.S. *Salmonella* en avicultura y en productos avícolas. *Avicultura Profesional*, 11(4), p. 166-172, 1993.
- BARROW, P.A. *Salmonella* control-past, present and future. *Avian Pathol.*, Abingdon, V.22, p 651-69, 1993.
- BATES, C. & GRANSHAW, D. Control de la *Salmonella*: un ejemplo de trabajo. *Avicultura Profesional*, 12(4), p.164-174, 1995.
- BERCHIERI, JR. A.; ÁVILA, F.A.; PAULILLO, A.C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MARQUES, M.A.S. & MATSUDA, H.J. Pesquisa de salmonelas em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. *Científica*, Botucatu, 11:165-168, 1983.
- BERCHIERI JR., A.; IRINO, K.; NEME, S.N.; PAULILLO, A.,C.; CALZADA, C.T.; FERREIRA, S.A & PESSOA, G.V.A. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. *Pesq. Vet. Bras.*, 4:83-85, 1984.
- BERCHIERI JR., A.; IRINO, K.; PAULILLO, A.C.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; KRONKA, S.N. & PESSOA, G.V.A. Pré-enriquecimento direto na pesquisa de *Salmonella* em farinha de carne. *Pesq. Vet. Bras.* 6: 93-97 p., 1986.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; ADACHI, S.Y.; CALZADA, C.T.; PAULILLO, A.C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; TAVECHIO, A.T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, 9(1/2):9-12, 1989.
- BERCHIERI, A.JR.; FERNANDES, S.A.; IRINO, K.; et al. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. *Revista de Microbiologia*, 24:1, 22-25; 1993.
- BOSQUIROLI, S. L. Estudo epidemiológico da ocorrência de *Salmonella* em uma integração de frangos de corte. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) -Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. 1996
- COSTA, F.N.; ROSSI, O.D.; TAVECHIRO, A.T. Sorotipos de *Salmonella* isolados de carcaças e cortes de frango, Jaboticabal-SP, In: CONFERÊNCIA APINCO, FACTA, Curitiba, p.57, 1996.
- GIORGI, W.; OHASHI, K. & ARAUJO, W.P. Farinha de carne e farinha de peixe como fontes de salmonelas para animais. *Arqs. Inst. Biol.*, São Paulo, 38: 59-62 p., 1971.
- GIRÃO, F.G.F.; OLIVEIRA, R.L.; FERREIRA, H.B.C.; NOGUEIRA, R.U.G. Isolamento de salmonela a partir de amostras de matérias-primas e rações e de materiais provenientes de aves. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA; CONGRESSO BRASILEIRO DE

- AVICULTURA, 8., CAMBORIÚ, 1983. *Anais. Camboriú, UBA, 1983. V.2, p.469-476.*
- HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J. ; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* de aves no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, 17(2), p.55-62, 1997.
- IRWIN, R.J.; POPPE, C.; MESSIER, S.; FINLEY, G.G.; OGGEL, J. A national survey to estimate the prevalence of *Salmonella* species among canadian registered commercial turkey flocks. *Can. J.Vet. Res.*, 58:263-267, 1994.
- MCIIRY, S.G.; NEILL, S.D. ; MC CRACKEN, R.M. Control de *Salmonella* Enteritidis por la indústria avícola de Irlanda do Norte. *Avicultura Profesional*, 9: 8-10 p.,1991.
- MIRANDA, J.B.N.; PESSOA, G.V.A; IRINO, K. & CALZADA, C.T. Ocorrência de *Salmonella* em farinhas utilizadas como matérias-primas na composição de rações animais. *Revta. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo*, 32: 157-160 p., 1978.
- NASCIMENTO, V.P. Programas de monitoração em salmonelas: Uma garantia na preservação da imagem dos produtos avícolas junto ao consumidor. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE PRODUÇÃO DE OVOS – APA, V, 95-108p., 19 95.
- PRESTES, A.A.; SILVA, E.N.; ITO, N.M.K.; JORGE, M. & HIPÓLITO, O. Salmonelas em matérias primas de origem animal destinadas a fabricação de rações. In: ANAIS VIII CONG. BRAS. AVICULTURA, Camboriú, 440-446 p.1983.
- SAITANU, K. & JERNGLINCHAN, J. Isolation of *Salmonella* from poultry feed and feed ingredients in Thailand. *J. Veterinar. Malaysia*, 6:1,21-24; 1994.
- SILVA, E.N.; REIS, R.; OLIVEIRA, R.L.; ÁVILA, F.A. Salmonelas em farinhas de origem aniaml destinadas à fabricação de rações. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, 25(2), p. 169-173, 1973.
- SILVA, E.N. *Salmonella enteritidis*, em aves e saúde pública. *Rev. Higiene Alimentar*, 9(37):7-12, 1995.
- SPECK, M. L. Compedium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Washington: APHA/Technical Committee on Microbiological for Foods. 1984. 914 p.
- VELDMAN, A.; VAHL, H.A.; BORGGREVE, G.J.; FULLER, D.C. A survey of incidence of *Salmonella* species and enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. *Veterinary Record*, 136:7, 169-172; 1995.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DO PERFIL HIGIÊNICO SANITÁRIO E PRESENÇA DE SALMONELAS EM FRANGO DE CORTE “IN NATURA”

RESUMO

SANTOS, E. J. Avaliação do Perfil Higiênico Sanitário e Presença de Salmonelas em Frango de Corte “In Natura”. Lavras: UFLA, 1998 (Dissertação - Mestrado em Ciência de Alimentos)

Procedeu-se a uma avaliação microbiológica de 33 carcaças de frangos, atendo-se à presença de salmonelas e enumeração de coliformes de origem fecal, cumprindo-se neste trabalho um programa de monitoramento e sugestão de medidas de controle da contaminação microbiológica. As aves foram agrupadas de acordo com sua dieta alimentar. Para o enriquecimento seletivo foram utilizados os caldos Tetrationato Muller-Kauffmann e Rappaport-Vassiliadis e na etapa de cultivo seletivo o ágar Rambach e SS (*Salmonella-Shigela*) a 37°C e 43°C. As estirpes bacterianas suspeitas foram identificadas através dos sistemas comerciais API 20E e Bac-Tray (I e II) e posteriormente enviadas para sorotipagem no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz. Foi evidenciada a presença de salmonela em 54,54% dos lotes de aves, comprovando a inadequação destes ao consumo humano de acordo com a legislação brasileira. Os sorotipos *S. Senftenberg* e *S. Infantis* presentes na carcaça podem estar associados à ingestão de alimento contaminado pelas aves. Nas rações e ingredientes foram encontrados os sorotipos *S. Senftenberg*, *S. Infantis*, *S. Give* and *S. Fyris*. Verificou-se a enumeração de coliformes de origem fecal bastante alta, indicando ser recomendável a adoção de medidas higiênico-sanitárias e operacional no abatedouro e na estocagem refrigerada que possam reduzir, de maneira significativa, a proliferação destes germes.

Comitê Orientador: Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho -UFLA (Orientadora)

ABSTRACT

SANTOS, E. J. Hygienic- Sanitary Profile and Presence of *Salmonella* in Fresh Poultry Meat. Lavras: UFLA, 1998. (Dissertation - Master Program in Food Science)

Thirtythree chicken carcasses were examined for the presence serovars of *Salmonella* and fecal coliform counts. The birds were divided in eleven groups according to the diets furnished of the animals. For the selective enrichment the Tetrionate Muller Kaufman and Rappaport Vassiliadis brothes and at the selective cultivation step the Rambach and SS (*Salmonella-Shigella*) agar at 37°C and 43°C were utilized. The suspected bacterial strains were identified by commercial systems API 20E and Bac Tray (I and II) and later sent for serotyping to the Bacterial Zoonosis Laboratory of Fundação Oswaldo Cruz. The presence of *Salmonella* sp was found in 54.55% of the bird groups, which makes it inadequate for human consumption according to the Brazilian microbiologic legislation. The presence of the serovar *S. Seftenberg* and *S. Infantis* can be associated with the intake of contaminated feed. In the feeds and feedstuffs of the birds the following serotypes were found: *S. Senftenberg*, *S. Infantis*, *S. Give* and *S. Fyris*. Microbiologycal tests for fecal coliform counts indicated the need for na improvement in sanitary and operational procedures at several steps in the slaughter house and also in refrigerated chilling storage, from where the carcasses came.

Guidance Committee: Dr. Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

1 INTRODUÇÃO

Sendo o Brasil um país produtor e exportador de carne de frango, sua indústria nacional tem se preocupado com o problema da sanidade avícola. Entretanto, o grande enigma da salmonelose reside na outra face, cuja forma clínica quase sempre é inaparente e rotulada em patologia aviária, como infecções paratíficas. Estas são responsáveis em grande parte, pela propagação de salmonelas a produtos de consumo humano.

Com muita probabilidade a amplitude de sorovares presentes nos produtos avícolas tem como causa primordial a veiculação de salmonelas através de rações. (Berchieri et al, 1989; Hofer, 1997).

Inerente às fontes que propiciaram a contaminação de aves ainda vivas, mesmo quando usadas boas técnicas de processamento durante o abate, estes microorganismos ainda poderão disseminar em todo o ambiente do abatedouro.

Almeida & Silva (1992) demonstraram que o escaldamento e o resfriamento reduziram a carga bacteriana, mas nas operações de depenação e evisceração ela voltou a aumentar. Os microorganismos presentes na pele, penas e intestinos das aves chegam até o tanque de escaldamento e depenadeiras. Nesta área eles podem ser transferidos às carcaças durante a permanência delas na água deste tanque e pelos dedos de borrachas das depenadeiras, através da ação mecânica e traumatizante que estes exercem (Almeida et al., 1993).

Alguns sorotipos de *Escherichia coli* estão associados com doenças das aves, mas porém, pode-se dizer que os sorotipos produtores de doenças nas aves não afetam o homem. Entretanto, um dos problemas da *Escherichia coli* é que alguns organismos podem tornar-se resistentes a certos antibióticos e, ocasionalmente, transferir esta resistência a outros membros das enterobactérias.

A exposição à *Salmonella* sp pode ocorrer em qualquer local ou momento durante todos os processos de produção ou processamento. A distribuição de salmonelas sobre condições naturais contribui para a ocorrência de infecção nas dezenas de hospedeiros. As aves submetidas à criação estão expostas a salmonelas em praticamente todo o seu ciclo de vida. Portanto as primeiras considerações quanto as medidas de prevenção devem ser em relação a evitar a transmissão.

O presente trabalho teve como objetivo um monitoramento microbiológico onde foi pesquisada a presença de salmonelas e determinado o NMP de coliformes fecais em frango “in natura “ alimentados com ração contaminada naturalmente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.2 Coleta de amostras das carcaças de frangos

Após receberem uma alimentação diferenciada (tabela 1) 33 frangos de corte ao 45º dia de vida foram escolhidos ao acaso e submetidos ao abate no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras. No decorrer deste abate foram realizadas etapas de sangria, escaldamento e depeação, sendo que a evisceração se deu em condições assépticas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

As carcaças foram agrupadas em um “pool”, de acordo com sua origem alimentar (tabela 1) e, devidamente, rotuladas para posterior análise.

TABELA 1 - Divisão dos grupos de aves em relação à dieta e idade

Grupos de aves	Alimentação/aves
A	Ração com farinha A/ pintos de 1 dia
B	Ração com farinha A/ pintos de 7 dias
C	Ração com farinha B/ pintos de 1 dia
D	Ração com farinha B/ pintos de 7 dias
E	Ração com farinha C/ pintos de 1 dia
F	Ração com farinha C/ pintos de 7 dias
G	Ração com farinha D/ pintos de 1 dia
H	Ração com farinha D/ pintos de 7 dias
I	Ração com farinha E/ pintos de 1 dia
J	Ração com farinha E/ pintos de 7 dias
K	Ração sem farinha de origem animal/ pintos de 1 dia

2.2 Métodos

Utilizou-se como regra geral o método descrito pela Associação Americana de Saúde Pública “American Public Health Association- APHA”, com as etapas a seguir (SPECK, 1984).

2.2.1 Pré-enriquecimento de rações e matérias-primas

No laboratório as amostras devidamente codificadas e pesadas em porções de 25g foram depositadas em frascos de boca larga contendo 225 mL de água peptonada tamponada a 1%. A incubação deste material foi realizada a 37°C em estufa bacteriológica por 24h, como pré-enriquecimento para o isolamento inicial de salmonela.

2.2.2 Pré-enriquecimento para carcaças de frango

Utilizou-se a técnica de enxágüe (Russel et al, 1997 com modificações), cada frango era enxaguado com água peptonada tamponada a 1% por 1:30 minutos, sob agitação manual e em shaker. O líquido de enxaguagem foi mantido à temperatura ambiente por seis horas e depois em estufa a 35°C/ 18 a 24h.

2.2.3 Enriquecimento seletivo

Aliquotas de 1 mL de amostra pré-enriquecida eram inoculadas nos caldos tetrionato Muller Kauffmann (TMK) e Rapaport-Vassiliadis (RV) nas temperaturas de 37°C e 43°C/ 18-24H.

2.2.4 Plaqueamento em ágar de cultivo seletivo

Foram utilizados dois tipos de ágar: ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e o ágar Rambach (RAM). A escolha decorreu do tipo de amostras que seriam trabalhadas, altamente contaminadas por outras enterobactérias. Após o período de incubação, os tubos dos caldos TMK e RV eram levemente agitados e retirada uma alçada para plaqueamento em estrias de esgotamento nas placas de petri contendo os ágar seletivos. As placas eram então incubadas por 18-24h de acordo com a temperatura de incubação dos caldos delas originados, 37°C e 43°C.

2.2.5 Triagem de colônias suspeitas

As colônias que apresentavam reações indicativas de serem salmonelas nos ágar seletivos eram selecionadas e passadas, com o auxílio de alça em forma de agulha, para tubos de triagem contendo o meio de ágar tríplice açúcar e ferro (TSI) e o ágar lisina ferro (LIA). A inoculação era feita através de picada central e estriamento sobre superfície inclinada. Procurava-se retirar até seis colônias suspeitas de cada uma das placas de ágar seletivos. Os tubos de triagem, após a devida identificação, eram incubados 18-24h em estufa a 37°C. Após este período, os tubos que apresentavam reações características de serem salmonelas eram selecionados para as provas bioquímicas de identificação genérica.

2.2.6 Identificação bioquímica

Para uma rápida identificação bioquímica foram utilizados os sistemas comerciais Bactray I e II (DIFCO) e o API 20E (BIOMerriex).

2.2.7 Tipificação sorológica

As cepas caracterizadas bioquimicamente como *Salmonella sp* foram identificadas, repicadas em frascos de vidro contendo ágar nutriente, fechados com tampa de borracha e lacre de alumínio, e armazenadas em geladeira para posterior envio ao Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro para a identificação sorológica e tipificação.

2.3 Enumeração de coliformes

Visando obter um perfil higiênico sanitário mais completo foi determinada a enumeração de coliformes totais e de origem fecal (SPECK, 1983).

Do líquido de enxaguagem, foram feitas diluições em 90 mL de água peptonada 0.1%, após esta diluição inicial foram feitas diluições subsequentes.

O teste presuntivo para coliformes de origem fecal foi feito em uma série de 3 tubos com caldo lauril sulfato triptose, incubando-se a 35 °C durante 48 horas. Das amostras com produção de gás foi feito o teste confirmativo em caldo EC a 45°C por 24 horas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As aves chegam contaminadas através da pele (externamente) ou devido à etapa de evisceração (contaminação interna) e na imersão desprendem os resíduos do abate na água. Os índices de isolamento desta etapa são bastante variáveis, pois dependem dos cuidados de sanitização da indústria, grau de contaminação externa e interna do lote, utilização ou não de medidas adicionais no resfriamento como aditivos à água e à própria taxa de reposição de água no tanque.

De acordo com Russel et al (1997), o método de enxágüe de carcaças tem ganhado popularidade e tem sido considerado o método mais apropriado para a remoção de salmonelas de carcaças de aves. Este método é utilizado particularmente para determinar populações bacterianas que são encontradas em nichos específicos ou em número reduzido na carcaça de aves.

No presente trabalho as aves foram abatidas e depois depenadas em depenadeira de borracha, sem cuidados de desinfecção e sem etapa de resfriamento. Foi isolada *Salmonella* em 54,54% dos grupos de aves como relatado na tabela 2.

Os sorotipos encontrados nas carcaças foram o *S. Senftenberg* e *S. Infantis*. O *S. Senftenberg* se destacou na frequência de acordo com a tabela 2, que pode ser observada tanto no alimento quanto na ave, já que em quatro grupos fica comprovada a presença do mesmo sorotipo no alimento e carcaças.

A taxa de contaminação de carcaças é variável. Machado et al. (1994) em Santa Catarina/RS, demonstraram que 13,3% das carcaças de frangos prontas para consumo estavam contaminadas por salmonela e os sorotipos identificados foram *S. Enteritidis* e *S. Agona*. Costa et al (1996) verificaram que 8,3% das amostras de carcaças de frango obtidas em abatedouro com controle higiênico-

**TABELA 2 - Sorovares de *Salmonella* em frango "in natura",
Número de isolamentos e respectiva fonte alimentar dos frangos**

Grupos de aves	Fonte alimentar		Carcaça de frangos	
	Ração	Farinha de carnes e ossos	sorotipos	n ^o de isolamentos
A		S. Senftenberg	S. Infantis	05
B		S. Senftenberg	S. Senftenberg	06
C		S. Senftenberg; S. Give; S. Infantis	S. Senftenberg	01
D		S. Senftenberg; S. Give; S. Infantis		
E	S. Infantis	S. Senftenberg	S. Senftenberg	07
F	S. Infantis	S. Senftenberg		
G		S. Fyris; S. Senftenberg; S. Give; S. Infantis		
H		S. Fyris; S. Senftenberg; S. Give; S. Infantis		
I	S. Infantis	S. Senftenberg; S. Give; S. Infantis		
J	S. Infantis	S. Senftenberg; S. Give; S. Infantis	S. Infantis	01
*Controle	S. Infantis		S. Senftenberg	02

*Ração sem adição de farinhas de origem animal.

sanitário estavam contaminadas, sendo que nas três primeiras colheitas não foi isolada *Salmonella*, enquanto que das 15 amostras analisadas na última colheita, 33,3% delas estavam contaminadas. Enquanto no abatedouro sem controle 13,3% das carcaças analisadas foram positivas para salmonela, nas duas primeiras colheitas, 30% das amostras de cada uma delas estavam infectadas nas duas últimas não foi isolada salmonela. O fato de não se isolar a bactéria em todas as colheitas sugere que alguns lotes de frangos, que são provenientes de diferentes locais, chegam aos abatedouros infectados pela bactéria e podem disseminá-la para as carcaças durante as fases do abate e processamento, enfatizando a importância do controle da salmonelose em nível de granja.

Os valores das contagens de coliformes fecais estão registrados na tabela 3. A legislação nacional não faz limitações para a presença de coliformes fecais. Entretanto, a adotada no Estado de São Paulo, conforme Decreto nº 12486, de 20 de setembro de 1978, estabelece o limite de 3×10^2 NMP/g para coliformes fecais.

De acordo com a portaria 01/87 da Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos, contagens acima de 10^7 revelaram que as condições higiênicas sanitárias da carne são insatisfatórias, o que significa que todas as amostras desta pesquisa não são satisfatórias para o consumo de acordo com este item que pode ser observado na tabela 3.

Nota-se na presente pesquisa que a adoção de medidas higiênicas sanitárias se fazem necessárias desde a fase da criação das aves até a fase de processamento e abate.

TABELA 3 - Avaliação das condições higiênico sanitárias através da contagem de coliformes fecais em frango de corte “in natura”

*Amostras	Coliformes fecais em NMP/g
Aves grupo A	$2,5 \times 10^7$
Aves grupo B	$2,5 \times 10^8$
Aves grupo C	$> 1,4 \times 10^8$
Aves grupo D	$> 1,4 \times 10^8$
Aves grupo E	$> 1,4 \times 10^8$
Aves grupo F	$> 1,4 \times 10^8$
Aves grupo G	$> 1,4 \times 10^8$
Aves grupo H	$> 1,4 \times 10^8$
Aves grupo I	$> 1,4 \times 10^8$
Aves grupo J	$> 1,4 \times 10^8$
Aves grupo K (controle)	$> 1,4 \times 10^8$

*As amostras foram agrupadas de acordo com dieta alimentar, sendo que as aves do grupo K receberam ração sem adição de farinha de carne e ossos e as demais com adição da mesma em sua formulação.

4 CONCLUSÕES

As carcaças apresentaram condições higiênico-sanitárias insatisfatórias indicando ser recomendável a adoção de medidas operacionais no abatedouro e na estocagem refrigerada que possam reduzir, de maneira significativa, a proliferação de germes e, ainda, eliminar qualquer quantidade de *Salmonella*. Os sorotipos *S. Senftenberg* e *S. Infantis* presentes na carcaça podem estar associados à ingestão de alimento contaminado pelas aves uma vez que os mesmos também foram isolados nos alimentos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P.F.; SILVA, G. N. Estudos sobre o controle e disseminação bacteriana em carcaças de frango em abatedouros industriais. *Arq. Med. Vet. Zoot.*, 44: 105-20 p., 1992.
- ALMEIDA, P. F. et al. Contaminação e disseminação bacteriana de carcaças de frangos em abatedouros. *Higiene Alimentar*, 7(27): 12-17, ago. 1993.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; ADACHI, S.Y.; CALZADA, C.T.; PAULILLO, A.C.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; TAVECHIO, A.T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, 9(1/2):9-12, 1989.
- COSTA, F. N.; ROSSI, O.D.; TAVECHIRO, A.T. Sorotipos de *Salmonella* isolados de carcaças e cortes de frango, Jaboticabal-SP, In: CONFERÊNCIA APINCO, FACTA, Curitiba, p.57, 1996.
- HOFER, E; SILVA FILHO, S. J. ; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* de aves no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, 17(2), p.55-62, 1997.
- MACHADO, R. A.; TOSIN, I.; LEITÃO, M. F. F. Occurrence of *Salmonella* sp and *Campylobacter* sp in chickens during industrial processing. *Ver. Microbiol.*, São Paulo, v. 25, n.4, 239-44 p., 1994.
- RUSSEL, S.M., COX, N.A & BAILEY, J.S. Sampling poultry carcasses and parts to determine bacterial levels. *J. Appl Poultry Science*, 6: 234-237, 1997.
- SPECK, M. L. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Washington: APHA/Technical Committee on Microbiological for Foods. 1984. 914 p.
- VELDMAN, A.; VAHL, H.A.; BORGGREVE, G.J.; FULLER, D.C. A survey of incidence of *Salmonella* species and enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. *Veterinary Record*, 136:7, 169-172; 1995.

