

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A OCORRÊNCIA DE  
SALMONELAS EM UMA EMPRESA DE INTEGRAÇÃO  
DE FRANGOS DE CORTE**

**Silvana Lazaretti Bosquioli  
Médica Veterinária**

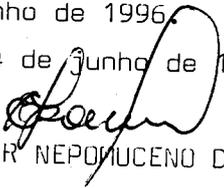
**Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva  
Orientador**

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do  
Título de Mestre em Tecnologia de Alimentos**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por SILVANA LAZARETTI BOSQUIROLI e aprovada pela Comissão Julgadora em 14 de junho de 1996.

Campinas, 14 de junho de 1996



PROF.DR. EDIR NEPOMUCENO DA SILVA  
Presidente da Banca

**Campinas - SP  
1996**

UNIDADE	7C
INSCRIÇÃO	
NUMERO	28090
DATA	667/96
PREÇO	78,11,00
DATA	24/07/96
REVISÃO	

CM-00090913-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

B744e

Bosquioli, Silvana Lazaretti  
Estudo epidemiológico sobre a ocorrência de salmonelas em uma  
empresa de integração de frangos de corte / Silvana Lazaretti  
Bosquioli. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Edir Nepomuceno da Silva  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Salmonela. 2. Frango de corte. 3. Epidemiologia. I. Silva, Edir  
Nepomuceno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Engenharia de Alimentos. III. Título.

**BANCA EXAMINADORA**



**PROF. DR. EDIR NEPOMUCENO DA SILVA**  
orientador

**PROF. DR. ANTÓNIO DE MELO SERRANO**  
membro



**PROF. DR. ARNALDO YOSHITERU KUAYE**  
membro



**PROF. DR. JOSÉ LUIZ PEREIRA**  
membro

**Campinas, 14 de junho de 1996**

**Ao Bráulio e aos nossos filhos,**

**Bruno e Luiza**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Edir Nepomuceno da Silva pela orientação e estímulo.

Ao Bráulio pela paciência e colaboração.

Às técnicas de laboratório Dirce e Raquel e à D. Jacinta pela amizade e colaboração no decorrer do trabalho.

Às colegas de pós-graduação, Flávia, Ana Lourdes e Patrícia.

Aos funcionários da empresa integradora, veterinários, técnicos de laboratório, da fábrica de ração, do abatedouro, da granja de matrizes e incubatório e especialmente à coordenadora dos laboratórios, Dra. Beatriz.

À Secretaria de Estado de Saúde do Paraná pela liberação para a realização do curso.

À empresa integradora de frangos de corte, que através de seu apoio financeiro proporcionou a realização da pesquisa.

# SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1. Incidência, distribuição e importância econômica .....	5
3.2. Etiologia.....	6
3.3. Patogenicidade.....	6
3.4. Hospedeiros naturais e eventuais .....	7
3.5. Granjas de reprodutoras e de frangos.....	8
3.5.1. Camas e ninhos de frangos e matrizes.....	8
3.5.2. Controle .....	9
3.6. Incubatório.....	10
3.6.1. Ovos destinados a incubação.....	10
3.6.2. Controle .....	11
3.7. Rações e matérias-primas de origem animal .....	11
3.8. Abatedouro .....	12
3.8.1. Controle .....	13
3.9. Amostragem.....	14
3.10. Isolamento e identificação .....	15
3.10.1. Preparação da amostra.....	16
3.10.2. Pré-enriquecimento.....	16
3.10.3. Enriquecimento em caldos seletivos.....	17
3.10.4. Isolamento em ágar seletivos e diferenciais .....	17
3.10.5. Testes bioquímicos .....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19

4.1 MATERIAIS.....	19
4.1.1. Cama de matrizes de frangos.....	19
4.1.2. Embriões de ovos bicados.....	20
4.1.3. Rações e matérias-primas de origem animal.....	21
4.1.4. Águas de abatedouro e carcaças de frangos.....	21
4.1.4.1. Coleta de amostra dos tanques de escaldagem e de pré-resfriamento.....	22
4.1.4.2. Coleta de amostra de carcaça de frango.....	22
4.2. MÉTODOS.....	23
4.2.1. Procedimento para isolamento de salmonelas.....	23
4.2.1.1. Pré-enriquecimento.....	23
4.2.1.2. Enriquecimento seletivo.....	24
4.2.1.3. Plaqueamento em ágar seletivo.....	24
4.2.1.4. Triagem de colônias suspeitas.....	24
4.2.1.5. Identificação bioquímica.....	24
4.2.1.6. Tipificação sorológica.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Amostragem utilizada no experimento.....	26
5.2. Salmonelas em camas de matrizes e frangos.....	28
5.3. Salmonelas em embriões de ovos bicados.....	28
5.4. Salmonelas em rações e matérias-primas de origem animal.....	29
5.4.1. Rações.....	29
5.4.2. Matérias-primas de origem animal.....	31
5.5. Salmonelas em águas do abatedouro e carcaças de frangos.....	33
5.6. Sorotipos identificados nas diferentes amostras.....	35
5.7. Resultados obtido com as modificações do método de enriquecimento seletivo.....	38
6. CONCLUSÕES.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
8. APÊNDICE.....	54
8.1. Leite desnatado.....	54

8.2. Água tamponada peptonada (BPW) 1%.....	54
8.3. Caldo tetracionato .....	54
8.3.1. Solução estoque de iodo .....	55
8.4. Ágar seletivos .....	55
8.4.1. Solução estoque de novobiocina .....	56
8.5. Ágar tríplice ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA) .....	56
8.6. Provas bioquímicas .....	56
8.6.1. Urease .....	57
8.6.2. Indol .....	57
8.6.2.1. Reagente de kovacs .....	57
8.6.3. Descarboxilação de aminoácidos: lisina e ornitina.....	57
8.6.4. Teste de citrato .....	58
8.6.5. Teste de malonato .....	58
8.6.6. Teste de fermentação de carboidratos - dulcitol.....	58

## LISTA DE TABELAS

### TABELA

1. Amostragem por ponto e total, utilizada para a pesquisa de salmonelas numa empresa integradora de frangos de corte num período de 10 semanas.....	26
2. Número de amostras positivas para salmonela por tipo de material amostrado, número de isolamentos e quantidade de sorotipos isolados .....	27
3. Presença de salmonelas em amostras de camas de galpões de uma empresa integradora de frangos de corte.....	28
4. Presença de salmonelas em amostras de embriões de ovos bicados de uma empresa integradora de frangos de corte.....	29
5. Presença de salmonelas em amostras de rações de uma empresa integradora de frangos de corte .....	30
6. Presença de salmonelas em amostras de farinhas de origem animal utilizadas na fabricação de rações de uma empresa integradora de frangos de corte.....	32
7. Presença de salmonelas em amostras de águas do abatedouro e em carcaças de uma empresa integradora de frangos de corte .....	33
8. Temperatura (°C) do tanque de escaldagem durante o experimento no período de coleta das amostras para pesquisa de salmonela .....	34

9. Quantidade de sorotipos isolados por tipo de amostra .....	36
10. Número de sorotipos identificados por amostra .....	37
11. Número de amostras positivas para o isolamento de salmonela nas diferentes semanas de trabalho, utilizando o meio de enriquecimento incubado em diferentes tempos.....	38
12. Número de amostras positivas para salmonela, usando-se o meio de tetracionato em diferentes tempos de incubação e plaqueamento em dois tipos de ágar seletivos .....	39
13. Número de isolamentos positivos para salmonelas (N) em ágar BGN e HE a partir de amostras enriquecidas com caldo tetracionato, seu percentual (%) e número de isolamentos (n) em somente um dos ágar .....	40

# ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A OCORRÊNCIA DE SALMONELAS EM UMA EMPRESA DE INTEGRAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

## RESUMO

Um estudo epidemiológico da ocorrência de *Salmonella* foi realizado em uma empresa de integração de frangos de corte, semanalmente, por um período de 10 semanas. 454 amostras foram analisadas dos seguintes materiais: cama dos galpões de matrizes e frangos de corte; saco da gema de embriões de ovos bicados; rações de matrizes e de frangos e farinhas de composição destas rações (carne, penas e vísceras); água do tanque de escaldagem e pré-resfriamento e carcaças após processamento no abatedouro. O caldo tetracionato (TT) foi usado como meio de enriquecimento, incubado a 43° C e plaqueado após 24h, 48h e 5 dias (enriquecimento retardado). Sorotipos de *Salmonella* foram isolados em quase todos os segmentos pesquisados. Os sorotipos isolados nas carcaças foram também encontrados nas rações e/ou farinhas, embriões de ovos bicados e camas, porém nem todos os sorotipos isolados de outros materiais estavam presentes nas carcaças. As farinhas de carne foram as amostras mais contaminadas. *Salmonella havana* foi o sorotipo mais prevalente e somente *Salmonella typhimurium* foi isolada de embriões de ovos bicados. A técnica de enriquecimento retardado (TER) produziu melhores resultados que o plaqueamento do TT a 24h e 48h de incubação. O controle de uma empresa de integração de frangos de corte deve levar em conta as múltiplas fontes de contaminação. Pintos de um dia e rações contaminadas parecem ser as principais fontes de contaminação em carcaças de frangos de corte.

# EPIDEMIOLOGICAL OCCURRENCE OF *SALMONELLA* IN A BROILER INTEGRATED COMPANY

## SUMMARY

An epidemiological survey on the occurrence of *Salmonella* serotypes was conducted in a broiler integrated company in a weekly interval for 10 weeks. 454 samples were taken from the following material: Litter from broiler breeders and broiler houses by drag swab; yolk sac from pipped embryos of broiler; feed from broiler breeder and broiler and, some of their ingredients as feed meal (meat, feathers and viscera); water from scald tank, pre-chiller and broiler carcasses at the processing plant. Tetrathionate (TT) broth was used as enrichment media incubated at 43°C and plated after 24h, 48h of incubation and using the delayed procedure. *Salmonella* serotypes were isolated from almost all segments. Serotypes isolated from the carcasses were, also, found in the feed and/or feed meals, pipped embryos and in the litter. Some serotypes isolated from the other material were not present in the carcasses. Feed meals were the most contaminated material by *Salmonella*. *S. havana* was the most prevalent serotype. Only the *S. typhimuirum* serotype was isolated from pipped embryos. The delayed procedures gave better result for *Salmonella* isolation than plating TT at 24h and 48h of incubation. The *Salmonella* control in a broiler integrated company must take in count the multiple sources of contamination. Day-old chicks and feed contamination seems to be the main important sources of *Salmonella* contamination for broiler carcasses.

## 1. INTRODUÇÃO

A presença de salmonelas em carcaças de frangos tem, pelo menos, dois grandes significados: a. na economia de produção de aves, onde as salmonelas atuam reduzindo a produtividade avícola durante a criação; b. na saúde pública, onde as carcaças contaminadas atuam como origem de surtos de infecção humana pelo consumo de alimentos preparados com estes produtos.

As salmonelas com risco potencial para a saúde pública, veiculadas por carcaças de frangos, geralmente, interferem pouco ou nada na produtividade avícola e têm origem na ave viva contaminada que chega ao abatedouro. Atualmente são descritos mais de 2.000 sorotipos diferentes com este potencial.

A tecnologia empregada para o abate reduz, mas não elimina a contaminação original por salmonelas. Os principais pontos críticos de disseminação da contaminação durante o abate de aves incluem a escaldagem das carcaças, evisceração e o resfriamento em tanques com água gelada. Portanto, a contaminação final das carcaças de frangos e seus produtos está na razão direta da contaminação da ave viva que chega ao matadouro.

Desta maneira, a redução ou eliminação da contaminação por salmonelas das aves vivas, durante a criação, passa a ser um dos pontos mais importantes na obtenção de produtos avícolas para o consumo alimentar livres destes agentes.

Devido a complexidade e custo do processo de erradicação de salmonelas das criações avícolas, as ações têm se concentrado, de uma maneira geral, na eliminação e redução de alguns, ou mesmo, de um único sorotipo que tenha se tornado mais prevalente ou de maior importância como vem acontecendo com *Salmonella enteritidis* (WIERUP et alii., 1992; SHARP et alii, 1992; MASON & EBEL, 1992).

Quase que a totalidade da produção de frangos de corte é feita por empresas integradoras. Estas, geralmente, produzem toda a ração necessária, criam suas matrizes e produzem os pintos de corte que são fornecidos aos seus integrados ou parceiros para criá-los. Os integrados recebem, além dos pintos, rações e toda a assistência. As criações de frangos são feitas em galpões com piso (cama) de maravalha de madeira. Há uma tendência em criar vários lotes seguidos sobre a mesma cama. A empresa integradora retira os frangos para abate na idade oportuna. Dos produtos não comestíveis do abatedouro, são produzidas farinhas como penas e vísceras que são incorporadas às rações. Além destas matérias primas e outras vegetais, as fábricas compram e utilizam outras de origem animal como farinha de carne bovina na formulação das rações.

Na criação de frangos de corte, várias são as possíveis fontes de salmonelas. Entre as mais importantes destacam-se as salmonelas que já chegam com os pintos e, geralmente, têm origem nos lotes progenitores (matrizes) e, as rações consumidas pelas aves. As aves infectadas eliminam salmonelas via fezes que contaminam suas camas. Outras fontes de salmonela também são importantes, como roedores, água de dessedentação, pássaros e animais silvestres, além das pessoas que trabalham com as aves e os equipamentos. Desta forma, é muito difícil definir qual a fonte mais importante ou a mais responsável pelos sorotipos encontrados na carcaça de frangos no abatedouro. As salmonelas têm seletividade para as diferentes espécies animais e apresentam variabilidade de resistência às condições ambientais. Se conseguíssemos determinar as principais fontes ou origens das salmonelas que encontramos nas carcaças, talvez, as ações fossem mais objetivas, com mais êxito e de menos custo.

Há vários métodos propostos para o isolamento de salmonelas de material não clínico. Entre eles, há muita diferença quanto a sensibilidade. De um modo geral, eles requerem um período de pré-enriquecimento em solução ou caldo não seletivo para a recuperação de células injuriadas. A próxima etapa ou a primeira, para alguns tipos de material, é o enriquecimento em caldos seletivos incubados em diferentes temperaturas e por períodos variáveis. Há descrição de que o aumento da temperatura de 37° C para 42-43 °C, com período prolongado de incubação (>48 horas) nesta fase, resulta no aumento de isolamentos de salmonelas (D'AOUST,1981; PERALES & AUDICANA,1989; WALTMAN et alii, 1991). A partir do enriquecimento em caldo seletivo, faz-se

plaqueamento em ágar seletivo, triagem das colônias suspeitas com posterior caracterização bioquímica e sorológica.

## 2. OBJETIVOS

2.1. Verificar a ocorrência de salmonelas em diferentes segmentos de uma empresa integradora de frangos de corte.

2.1.1. Pesquisa de salmonelas em camas de matrizes em produção.

2.1.2. Pesquisa de salmonelas em embriões de ovos bicados coletados no incubatório.

2.1.3. Pesquisa de salmonelas em rações de matrizes e frangos.

2.1.4. Pesquisa de salmonelas em matérias primas de origem animal (farinhas de carne, penas e vísceras) utilizadas na fabricação das rações.

2.1.5. Pesquisa de salmonelas em camas de frangos.

2.1.6. Pesquisa de salmonelas em água de escaldagem das carcaças no abatedouro.

2.1.7. Pesquisa de salmonelas em água do tanque de pré-resfriamento de carcaças no abatedouro.

2.1.8. Pesquisa de salmonelas em carcaças no abatedouro.

2.2. Procurar relacionar os sorotipos das carcaças com possíveis origens.

2.3. Comparar algumas variáveis na metodologia de isolamento de salmonelas, quanto à sua sensibilidade.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As salmoneloses são um grande problema da indústria avícola nacional e internacional. Nas aves, as infecções causadas pelas espécies *Salmonella pullorum* e *Salmonella gallinarum* denominam-se pulrose e tifo aviário e são hospedeiro-específicas. As demais espécies podem ser classificadas como agentes das chamadas infecções paratífóides (MALLINSON et alii, 1989b). No homem, as salmoneloses são causadas pelo último grupo e em sua maioria transmitidos via produtos de origem animal, entre eles carne de aves e ovos (NOTERMANS et. alii, 1992).

#### 3.1 Incidência, Distribuição e Importância Econômica

As infecções paratífóides aviárias e humanas ocorrem em todas as partes do mundo e apesar de isolamentos de sorotipos exóticos acontecerem por curtos períodos de tempo, a maioria dos sorotipos isolados são característicos do local. Aproximadamente 70% dos surtos tanto em humanos quanto em animais são devidos a 10 ou 12 sorotipos mais freqüentes ( NAGARAJA et alii, 1991).

As perdas econômicas na indústria avícola concentram-se principalmente em incubatórios, com altas taxas de mortalidade em aves jovens, porém surtos em aves mais velhas também ocorrem com freqüência, inclusive aumentando sua susceptibilidade a outras doenças (NAGARAJA et alii, 1991).

A salmonelose humana segundo estima TODD (1989) custa aos Estados Unidos um total de \$ 4 bilhões anualmente através de gastos médicos e queda de produtividade. Além disso, até a metade dos anos 80, as estatísticas não relacionavam os produtos avícolas como as principais fontes de salmoneloses em surtos humanos, quadro este que se alterou profundamente daí até a atualidade, inclusive com o aumento da produção e consumo da carne de frango e ovos no mundo todo (JONES et alii, 1991b).

### 3.2 Etiologia

As salmonelas do grupo paratifóide são bacilos Gram- negativos não esporulados, normalmente móveis através de flagelos peritríquios. São microorganismos 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 a 47°C e atividade de água acima de 0,94 (SIMONSEN et alii, 1987). Temperaturas de 60° C por 5 minutos destroem  $3 \times 10^8$  células/g de carne de galinha de *Salmonella typhimurium* (BAYNE et alii, 1965). As salmonelas são susceptíveis a desinfetantes comuns.

### 3.3 Patogenicidade

Basicamente a infecção paratifóide é uma doença de aves jovens com condições ambientais, graus de exposição e presença de infecções concorrentes tendo uma grande importância na severidade do surto. Em surtos agudos, com mortes ocorrendo na incubação ou durante os primeiros dias após o nascimento, nenhum sinal pode ser notado. Nestes casos a infecção é adquirida por transmissão ovariana ou contaminação no incubatório. Uma alta proporção de ovos bicados ou não bicados contendo embriões mortos podem ser observados ao nascimento (MALLINSON & SNOEYENBOS, 1989b; NAGARAJA et alii, 1991).

Somente alguns sorotipos são capazes de transmitir a infecção através da via vertical, como por exemplo *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella berta* (NIELSEN, 1992.)

A mortalidade é mais freqüente nas 2 primeiras semanas após o nascimento, normalmente entre o 5° e o 10° dia (NAGARAJA et alii, 1991), e raramente ocorre doença clínica em aves com mais de 3 semanas de idade. Entretanto, se estas aves estiverem infectadas serão em sua maioria portadoras, excretando através das fezes o microorganismo, contribuindo para a continuidade do ciclo de contaminação; através da reprodução, onde serão infectados incubatórios e novos criatórios ou no caso de aves para abate, onde podem ficar contaminados abatedouros e produto final (LAHELLEC et alii, 1986; NAGARAJA et alii, 1991).

No homem as salmoneloses são causas freqüentes de toxinfecções alimentares. Nos EUA calcula-se que ocorram 2 milhões de casos por ano com 2.000 mortes (ROBERTS, 1988). Os sintomas mais comuns são diarréia auto-limitante, dores abdominais e vômito podendo ainda ocorrer febre e dores de cabeça. Em casos severos que variam com a imunocompetência do hospedeiro podem aparecer desordens neurológicas e morte ( DOYLE & CLIVER,1990; NOTERMANS et alii,1992).

O principal alimento incriminado na transmissão da infecção ao homem hoje é a carne de frango, e a explicação é o crescente aumento da produção e consumo desta espécie no mundo ( OOSTEROM & NOTERMANS, 1992).A transmissão de salmonelas através do ovo na cadeia alimentar humana parece acontecer principalmente através da contaminação da casca por conteúdo fecal e raramente por transmissão transovariana ( MELLOR & BANWART, 1965; FORSYTHE et alii, 1967; SHIVAPRASAD et alii, 1990).

#### 3.4 Hospedeiros naturais e eventuais

As salmonelas do grupo paratifóide ocorrem em animais de sangue quente e frio. Entre as aves domésticas são encontradas principalmente em galinhas e perus. São comuns também em todos os mamíferos domésticos e em répteis. Nestes, a doença clínica só ocorre em animais adultos sob extremas condições de "stress" e debilidade, ou naqueles muito jovens (NAGARAJA et alii, 1991).

Ratos e camundongos são freqüentemente carreadores intestinais de organismos do grupo paratifóide, principalmente *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis* (SATO et alii, 1970; OPTIZ,1992), podendo infectar rações e o ambiente através de seus excrementos. Outros pesquisadores estudando fontes de salmonelas em granjas encontraram: roedores, pássaros e lagartos (GOYAL & SINGH, 1970); camundongos, borboletas, moscas e gatos (KRABISCH & DORN, citados por NAGARAJA et alii, 1991).

Salmonelas foram também encontradas em vários insetos incluindo moscas, pulgas, borboletas e baratas (NAGARAJA et alii 1991); besouros, moscas domésticas, carrapatos e piolhos (HAREIN et alii, 1970). Considera-se que a presença de insetos pode

ser causa de infecção por salmonela em sucessivos lotes de aves (NAGARAJA et alii, 1991).

O contato com o homem também pode ser possível fonte de infecção envolvendo não somente os tratadores como também os produtos de dejetos humanos lançados no meio ambiente. As aves por sua vez também podem servir de fontes para a infecção de outros animais domésticos na fazenda (NAGARAJA et alii, 1991).

### 3.5 Granjas de reprodutoras e de frangos

Existem duas fontes primárias de salmonela numa granja: aves previamente infectadas ou rações (BARROW, 1992). Uma vez estabelecida uma infecção do grupo paratifóide na granja ela pode ser transmitida vertical e horizontalmente. A transmissão vertical ocorre com poucos sorotipos, porém a horizontal é rapidamente transmitida por inalação, por contaminação fecal de ração e água ou consumo direto de matéria fecal, sendo que repetidas exposições ao agente resultam em infecções de maior severidade (GAUGER et alii, 1948; NAGARAJA et alii, 1991). Na transmissão entre aves adultas fezes são provavelmente a maior fonte de infecção. A população bacteriana e natureza do ambiente estão entre os muitos fatores que determinam a extensão de tais transmissões (SNOEYENBOS et alii, 1970; NAGARAJA et alii, 1991).

Além da transmissão direta de aves adultas e portadoras para aves mais jovens, fômites como sapatos, sacos de ração, caixas de transporte ou equipamento do galpão e o próprio homem podem ser agentes da infecção.

#### 3.5.1 Camas e ninhos de frangos e matrizes.

As camas e ninhos nos quais as aves são alojadas no galpão são uma grande fonte de contaminação ambiental. As taxas de isolamento neste tipo de amostra são variáveis entre os muitos trabalhos existentes (SNOEYENBOS, 1971; JONES et alii, 1991b) e segundo os autores isto explica-se por diversos fatores envolvidos, como idade do lote, taxa de animais infectados e de excreção, vetores animais, manejo e período de

utilização da cama. Por outro lado, método de amostragem e cultura também são importantes (MALLINSON & SNOEYENBOS, 1989b).

O período de utilização da cama, isto é, a quantidade de lotes que são alojados sem troca da matéria de cobertura, parece ser um fator importante na colonização das aves jovens. FANELLI et alii (1970) demonstraram que as salmonelas não persistem por muito tempo em camas ou ninhos velhos, como acontece nos novos. TURNBULL & SNOEYENBOS (1973) e JONES (1991) explicam que isto decorre por dois fatores principais: a atividade de água desfavorável à viabilidade da célula de salmonela e o alto pH da amônia dissolvida na umidade do ninho.

### 3.5.2 Controle

As principais medidas de prevenção passam obrigatoriamente pelo controle das rações e os cuidados de manejo e reposição de lotes. As rações deverão provir de indústrias idôneas, devem ser peletizadas e transportadas dentro de normas rígidas de higiene. Na granja, os silos de armazenamento deverão ser construídos de forma a não permitirem a entrada de aves de vida livre ou roedores. Os equipamentos de distribuição e os comedouros e bebedouros deverão ser periodicamente lavados e desinfetados. 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. A área de galpões deve ser restrita ao acesso de outros animais e visitas. HENKEN et alii (1992) em um estudo multifatorial para controle da salmonelose aviária na granja, descrevem como de importância relevante o uso de lava-pés com desinfetantes e a utilização de barreiras sanitárias (com banhos, troca de roupas e bctas) na entrada dos galpões. A reposição das aves sobre camas utilizadas por lotes sem problemas (OLESIUK et alii, 1971) e a técnica da competição exclusiva parecem ser de grande valia. Através desta técnica são administradas às aves jovens fezes ou conteúdo intestinal de aves adultas saudáveis, com o objetivo de adquirirem resistência a colonização por salmonelas (JONES, 1991). Outra forma de controle seria a chamada colonização integrada (BAILEY, 1988). Esta técnica combinaria a competição exclusiva, boas práticas de higiene na granja, amostragem de pontos

críticos e vacinações, estas ainda experimentais (SUPHABPHANT et alii, 1983; CORRIER, 1990)

A sanitizaçãc de galpões que abrigaram aves contaminadas é também de grande importância na manutenção do ciclo da salmonela. WESTON (1976) citado por NAGARAJA et alii (1991), relata uma granja em que o mesmo sorotipo foi isolado dos galpões anualmente durante 10 anos. Um dos sanitizantes utilizados antes da entrada de novo lote no galpão é a formalina em soluções de 4 ou 6% (WILLIANS, 1980).

### 3.6. Incubatório

Um dos pontos críticos no controle do ciclo da salmonelose são os incubatórios. Estudos recentes nos Estados Unidos demonstram taxas de até 75% de positividade para salmonela em penugens e cascas de ovos nas bandejas de incubação (BAILEY et alii, 1992). Amostras de ar coletadas dentro de ambientes contaminados positiveram por diversas semanas, sendo uma forma importante de manutenção do patógeno nestes locais (NAGARAJA et alii, 1991).

#### 3.6.1. Ovos destinados a incubação

O problema dos ovos contaminados no incubatório começa na granja de poedeiras, principalmente devido a cascas infectadas por matéria fecal das portadoras sãs, uma vez que a contaminação interna é pequena e parece estar restrita a poucos sorotipos (NIELSEN, 1992). A contaminação fecal das cascas de ovos acontece no momento da postura, ou logo após, por contato com camas, ninhos ou mesmo gaiolas contaminadas. Da casca as bactérias penetram através dos poros e multiplicam-se no interior dos ovos, podendo infectar ou não o embrião.

Os incubatórios que não tem assegurada a qualidade microbiológica dos ovos incubados, provavelmente têm suas instalações contaminadas, altas taxas de embriões mortos na casca e podem ainda produzir aves que ao nascimento excretem milhões de salmonela no mecônio, contaminando outras aves nascidas no mesmo lote

(BARROW,1992). Este fato tem reduzido a efetividade dos tratamentos de exclusão competitiva que preveniriam a colonização (BAILEY,1992).

### 3.6.2 Controle

As medidas de prevenção a serem adotadas pelos incubatórios começam com a seleção, limpeza e desinfecção dos ovos e sua procedência. Granjas de matrizes portadoras não deveriam ser utilizadas como fonte de abastecimento para incubatórios ou venda de ovos "in natura". O não emprego destas granjas ou dos lotes que abrigassem aves contaminadas seria uma boa medida de controle e ovos destinados a incubatórios deveriam provir de aves que se mantivessem em ambiente no qual a exposição fosse mínima. Os ovos provenientes destes lotes deveriam ser comercializados somente após algum tipo de processamento (CORRIER,1990).O uso de ovos limpos diminui muito a possibilidade de introdução da infecção no incubatório através da contaminação fecal.

### 3.7 Rações e matérias-primas de origem animal

As rações e as matérias-primas de origem animal são as fontes mais comuns de salmonelas do grupo paratífóide para as aves (HACKING,1977; BERCHIERI Jr. et alii,1984; GABIS,1991; OOSTEROM & NOTERMANS,1992). EGGER (1978), citado por NAGARAJA et alii (1991), reportou que entre 1975-77, 908 salmonelas de 60 sorotipos diferentes foram isoladas de rações avícolas de origem animal, originárias de 23 países no "Swiss Veterinary Directorate's Meat Bacteriology Section".

A contaminação de rações através de sub-produtos de origem animal que as compõem é praticamente um quadro que se mantém nos últimos 20 anos (NAGARAJA et alii, 1991). Nos processos de fabricação de farinhas, as altas temperaturas destroem as células de salmonelas, porém o ambiente em que estas são armazenadas e manipuladas torna-se a fonte primária direta de recontaminação, principalmente devido à umidade destes locais (GABIS,1991). Nas fábricas de ração, o problema continua e apesar de nova exposição ao calor e inclusive ao processo de peletização, novamente o ambiente e a manipulação posterior, inclusive o transporte, introduzem a salmonela na ração (NIELSEN,1992). HENKEN et alii (1992) acreditam que o controle da contaminação

através do processamento de rações é ponto fundamental em qualquer programa de monitoramento.

Correlação direta de sorotipos de salmonela isolados de rações de aves e de cama de galpões que receberam esta ração foi observada por HACKING (1977). Da mesma forma MACKENZIE & BAINS (1976) encontraram os mesmos sorotipos em ingredientes de rações e água de enxágüe de carcaças.

### 3.8 Abatedouro

A contaminação no abatedouro pode ocorrer de diversas maneiras, sendo o transporte uma delas. e RIGBY & PETTIT (1980), CAMPBELL et alii, (1984) e CORRIER (1990), demonstraram que o percentual de frangos portadores de *Salmonella typhimurium* passou de 23,5 para 61,5% quando as aves foram colocadas em caixas de transporte em relação a controles não transportados nestas condições. Estas caixas alojam de 10 a 12 aves e são colocadas umas sobre as outras no caminhão, onde a matéria fecal espalha-se principalmente aderindo às penas e regiões pericloacais. Em outro estudo, 24 frangos colocados em caixas contaminadas com *Salmonella alachua* tornaram-se portadores, indicando que animais expostos a este tipo de transporte podem rapidamente infectar-se (NAGARAJA et alii, 1991).

A contaminação cruzada dentro do abatedouro, principalmente por fluxo de pessoas entre áreas limpas e sujas ou mesmo por fluxo das linhas de abate (MCBRIDE et alii, 1980); a sanitização insuficiente ou inadequada do ambiente (MORRIS & AYRES, 1960; CAMPBELL et alii, 1982) e a contaminação das mãos dos manipuladores através de equipamentos contaminados ou falta de higiene (CAMPBELL et alii, 1984), são problemas constantes na maioria dos abatedouros, por falta de monitoramento ou gerenciamento.

A escaldagem, para posterior depenagem, consiste na imersão das aves em tanques de água com temperaturas que variam conforme a técnica de abate de 52°C a mais de 60°C, variando conseqüentemente os tempos de permanência no tanque. Esta etapa é considerada crítica por vários motivos, sendo entre eles de importância a reposição de água que sai junto às penas e a quantidade de matéria orgânica introduzida

por resíduos de fezes e sangue. Esta alcaliniza a água e favorece a sobrevivência de salmonelas, contaminando aves não portadoras (HUMPHREY, 1981).

A etapa de depenagem pode ser uma nova fonte de inoculação de patógenos na carcaça através da ação dos dedos de borracha da depenadeira, que poderia além da contaminação superficial inocular a salmonela nos folículos das penas (DOUGHERTY, 1974; MCBRIDE et alii, 1980; CAMPBELL et alii, 1984).

Na evisceração a utilização da automatização é fator redutor da contaminação, desde que a sanitização do equipamento seja eficiente. Nas operações manuais, a temperatura da água dos pontos de desinfecção de facas e mãos e a conscientização dos manipuladores às práticas de higiene são fundamentais.

Os tanques de água de pré-resfriamento e resfriamento de carcaças (MCBRIDE et alii, 1980; SHACKELFORD, 1988; LILLARD, 1990) são pontos críticos que devem ser monitorados constantemente na indústria. Após a evisceração a carcaça passa por uma ducha de água clorada para retirada de sujidades e sangue. Segue para um tanque de pré-resfriamento com o objetivo de baixar a temperatura da carne tornando a etapa de resfriamento mais rápida e eficaz. Esta etapa utiliza tanques com gelo em escamas ou através de gás amônia. Os níveis de contaminação de carcaças através dos tanques de pré-resfriamento e resfriamento são motivo de várias pesquisas em vários países, com diferentes resultados (MORRIS & WELLS, 1970; MACKENZIE & BAINS, 1976; MCBRIDE et alii, 1980; CAMPBELL et alii, 1983; DUBERT, 1988; BERNARDO & MACHADO, 1989; BAILEY et alii, 1991 e JONES et alii, 1991a) e isto deve-se as variadas metodologias utilizadas e ao emprego ou não de métodos de controle epidemiológicos nas fases e locais de produção. No entanto, todos os autores são unânimes na afirmativa da existência da contaminação no produto final.

### 3.8.1 Controle

As medidas de controle no abate começam obrigatoriamente pelas práticas de higiene e educação dos manipuladores (OOSTEROM, 1991). Para este autor, novas técnicas e novos equipamentos, como a escaldagem individual e depenagem por água

em alta pressão, melhoria nos equipamentos de evisceração e sua adequada desinfecção, bem como estudos sobre temperatura e cloração de água fazem parte desses esforços.

Outra frente de pesquisa estuda a eliminação do patógeno após o processamento, retirando-o do produto final. Assim tratamentos de imersão da carcaça em água a 60°C por 10 minutos ou adição de cloro a 200 ppm ou sorbato de potássio a 2,5% são propostos por MORRISON & FLEET,(1985); utilização de ácidos orgânicos de cadeia curta, como o ácido láctico para descontaminação superficial das carcaças (OOSTEROM, 1991); e a utilização da irradiação, com a vantagem de poder ser usada sobre carcaças já embaladas (STEELE,1992).

### 3.9 Amostragem

Um dos maiores problemas do analista é o tamanho do lote e quantidade de amostras que deve ser examinado. As bactérias raramente encontram-se uniformemente dispersas num substrato e desta forma amostras previsivelmente positivas podem ser agrupadas sem perdas em sua taxa de positividade. HUHTANEN et alii (1972) demonstraram que a utilização de apenas uma amostra de 300g de farinha de carne e ossos ou 10 amostras de 30 g praticamente renderam resultados iguais, sendo que no primeiro tamanho de amostra 17 salmonelas foram isoladas e no segundo 18. As amostras de farinhas de origem animal, ou seja, carne, vísceras, penas, sangue e ossos podem ter um bom rendimento de isolamentos com amostras de 25 g (FRICKER, 1987).

Para a recuperação de baixos níveis de salmonelas em carcaças inteiras de frangos vários pesquisadores reportam que o método mais efetivo de amostragem é o do enxágüe (NOTERMANS et alii, 1975; COX et alii, 1978; D'AOUST et alii, 1982). IZAT et alii (1991) trabalhando com a técnica do enxágüe combinada à de número mais provável, encontraram que quanto maior o número de vezes que a carcaça é enxaguada, maior a taxa de recuperação, supondo então que os organismos estariam firmemente ligados à pele antes do processamento.

SNOEYENBOS et alii (1967) sugeriu que a detecção da infecção era um dos principais problemas no controle da salmonelose nas granjas e que amostras de ninho deveriam ser usadas para sua detecção. OLESIUK et alii (1969) e SNOEYENBOS (1971) trabalhando com infecção experimental por *Salmonella Typhimurium* demonstraram que ninhos tiveram uma frequência de isolamento maior que outras amostras ambientais, sendo também mais efetivos que o método do suabe cloacal. Porém, WILLIAMS et alii, (1976) concluíram que a confiabilidade deste dado deve ser limitada, pois a excreção dos organismos paratífóides pode ser intermitente, e a falha na detecção neste tipo de amostra não provaria ausência de infecção no galpão.

A utilização da técnica do suabe de arrasto (MALLINSON et alii, 1989a) demonstrou ser uma forma muito eficiente de monitoramento de galpões, uma vez que a amostragem é feita rastreando-se o chão de toda a construção, conseqüentemente aumentando-se as chances de isolamento da salmonela. Em outro trabalho (1989b) o autor demonstra que a habilidade de detecção de salmonelas está relacionada a taxa de excreção, sobrevivência do patógeno no substrato, amostragem e método de cultura.

A recuperação de salmonelas em amostras fecais ou embriões mortos no ovo indicam probabilidade de doença clínica na progênie. O exame bacteriológico de material de gema de embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação seriam um método prático segundo BEATTIE (1960) de detectar galpões de matrizes portadoras e a melhor fonte de recuperação de salmonelas em embriões segundo NAGARAJA et alii (1991).

### 3.10 Isolamento e Identificação

O sucesso no isolamento de salmonelas é um complexo de procedimentos multifatoriais. Alguns são bem estabelecidos, outros não, (HARVEY & PRICE, 1979) e desta forma empregam-se várias combinações de meios e métodos no intuito de alcançar-se o maior número de isolamentos possíveis ( D'AOUST, 1984); porém um fator de suma importância é a sensibilidade e experiência do analista ( HARVEY & PRICE, 1979).

Comumente cinco etapas básicas são utilizadas na maioria dos métodos para detectar, isolar e identificar salmonelas: pré-enriquecimento, enriquecimento em caldo

seletivo, isolamento em ágar seletivos e diferenciais, caracterização bioquímica e presumível identificação do gênero *Salmonella* e finalmente a confirmação sorológica. Os métodos tradicionais e oficiais, no entanto, foram desenvolvidos essencialmente para detecção do patógeno em amostras clínicas, sendo que em amostras de alimentos ou produtos processados como no caso de rações, geralmente o baixo número de células e sua debilidade devido ao processamento, são fatores de falha na detecção ( ANDREWS, 1985).

### 3.10.1 Preparação da amostra

Uma das preocupações do analista deve ser a eficiente preparação da amostra, antes do pré-enriquecimento. Assim, dependendo do tipo de amostra, técnicas de agitação, trituração, enxágue e submersão tem sido utilizadas (ANDREWS, 1985; FRICKER, 1987).

### 3.10.2 Pré-enriquecimento

É a primeira etapa dos métodos convencionais de detecção de salmonelas. Tem por função primária rehidratar células que tenham sido desidratadas durante processamento, reparar células danificadas e após ser estabelecida um condição fisiológica estável, poder servir como fonte de nutrientes para a proliferação. Os meios variam muito e os mais utilizados são: caldo lactose, caldo soja tripticaseína, leite desnatado e água tamponada peptonada (ANDREWS, 1985; FRICKER, 1987). As temperaturas utilizadas para esta etapa são de  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $41-43^{\circ}\text{C}$  (D'AOUST & MAISHMENT, 1979), porém segundo FRICKER (1987), em situações onde as células estariam em grande parte injuriadas a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  é a mais indicada. Vários pesquisadores estudando tempo de incubação nesta fase encontraram que em 24 h conseguem-se as melhores taxas de recuperação ( FRICKER, 1987).

Algumas amostras devido à sua natureza e grau de contaminação, não necessitariam a primeira etapa de pré-enriquecimento, sendo incubadas diretamente em caldos seletivos ( Food and Drug Administration, 1984). Isto devido a flora acompanhante

poder desenvolver-se abundantemente naquela fase, dificultando a detecção da salmonela.

### 3.10.3 Enriquecimento em caldos Seletivos

Nesta etapa muitos caldos são empregados sendo que os mais utilizados são o caldo tetrionato (TT), o caldo selenito cistina (SC) e o Rappaport Vassiliadis (RV). Nos últimos anos tem-se buscado através da alteração de fórmulas originais aumentar a seletividade desses meios ( EWING, 1986; FRICKER, 1987).

Com relação à temperatura de incubação, EWING (1986) recomenda como regra geral para isolamento de enterobactérias a temperatura de 35-37°C, porém para o gênero *Salmonella* a temperatura de 43°C por 24 h e 48 h tem sido mais eficiente (D'AOUST, 1981; EWING, 1986; PERALES & AUDICANA, 1989; CALDERON & FURLANETTO, 1991). WALTMAN et alii aumentaram ainda mais o período de incubação em caldo TT para até 7 dias em temperatura ambiente, conseguindo maior eficiência nos isolamentos.

O volume de transferência do caldo de pré-enriquecimento para esta etapa não tem influência na sensibilidade do meio (D'AOUST, 1984) e volumes superiores a 1 ml somente encarecem a análise (PERALES & AUDICANA, 1989).

### 3.10.4 Isolamento em ágar seletivos e diferenciais.

Uma grande variedade de meios seletivos e diferenciais são empregados para isolamento de salmorelas em placa. Os fatores mais importantes para sua efetividade são a habilidade de suportar o crescimento de salmonelas, a inibição de bactérias interferentes, a diferenciação das colônias, estabilidade e reprodutibilidade ( MOATS, 1981; FRICKER, 1987). Os agentes seletivos mais comuns utilizados para conseguirem-se estes efeitos incluem sais biliares ( ágar MacConkey, Hektoen entérico e Salmonella-Shigella); desoxicolato de sódio (ágar desoxicolato de sódio e xilose-lisina desoxicolato); corante verde brilhante ( ágar verde brilhante); sulfas e antibióticos adicionados a vários tipos de ágar. Muitas vezes um meio contém vários agentes seletivos, visando sempre uma melhor efetividade.

O antibiótico novobiocina foi utilizado por vários pesquisadores ( HOBEN et alii, 1973; REAMER et alii, 1974; MOATS, 1974; MALLINSON, 1990; WALTMAN et alii, 1991) e tem sido efetivo na prevenção do crescimento de *Proteus*.

### 3.10.5 Testes bioquímicos

Vários meios de triagem são utilizados com o propósito de preliminarmente isolar salmonelas, sendo que o ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e o lisina ferro (LIA) parecem ser os mais empregados( MOATS, 1981; EWING, 1986).

Entre os meios bioquímicos diferenciais empregados usualmente para a separação de salmonelas de outras enterobactérias são de valia: o teste da urease para diferenciar *Proteus*; decarboxilação da ornitina para diferenciação de *S. typhi*, decarboxilação da lisina diferenciando *Citrobacter* e desaminação do dulcitol e malonato para diferenciação do grupo arizona ( MOATS, 1981; EWING, 1986).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Todo o material necessário ao desenvolvimento do trabalho foi coletado de vários segmentos de uma única empresa de integração de frangos de corte localizada na região de Campinas, São Paulo, no período de maio a agosto de 1991. As coletas foram realizadas durante 10 semanas, com amostragem por ponto e total como indicado na Tab. 1. As amostras eram coletadas e levadas ao Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp para as análises, num período máximo de 24 h. Eram mantidas em refrigerador e transportadas em caixas de isopor sob temperatura aproximada de 4°C. A empresa possuía a granja de matrizes que produzia os pintos da integração de frangos, a fábrica de ração e o abatedouro.

### **4.1. MATERIAIS**

#### **4.1.1. Cama de matrizes e de frangos**

Foram analisadas 74 amostras de camas sendo 38 das matrizes responsáveis pelo fornecimento de pintos de um dia e 36 de galpões de frangos. As camas eram constituídas de maravalhas de madeira colocadas sobre o piso. Nos galpões de frangos utilizava-se alternativamente palha de trigo e casca de amendoim. O método de coleta utilizado foi o do suabe de arrasto (MALLINSON et alii, 1989a) que consiste em arrastar almofadas de gaze estéril, dobradas e presas a um barbante com um clipe, através do piso do galpão. Cada unidade desse suabe era composta de duas almofadas presas a um pedaço de barbante de aproximadamente 1,5 m, sendo uma amarrada numa das extremidades e outra a 0,6 m da primeira, dando um formato de Y. Os suabes eram confeccionados, esterilizados (121°C, 15 lb, 15min), acondicionados individualmente em sacos plásticos estéreis e umedecidos com 5 a 7 ml de leite desnatado a 20%. Após congelados eram enviados à equipe técnica responsável pela unidade de matrizes ou à equipe técnica da integração de frangos.

Na granja de matrizes, após escolha do galpão a ser coletado, o funcionário responsável pela unidade retirava do "freezer" o suabe com uma hora de antecedência. No galpão o saco plástico era aberto e uma das pontas do barbante facilmente retirada. O restante era puxado de uma só vez e colocado no chão. O galpão era dividido em quadrantes e utilizou-se um suabe para cada um deles, por no mínimo 10 minutos; sendo que em cada quadrante rastreava-se primeiro próximo às paredes para depois vir ao centro, buscando cobrir-se a maior área possível.

Após a coleta o suabe era novamente depositado no saco plástico e mantido sob refrigeração até o envio ao laboratório (aproximadamente 4 horas). Os galpões coletados abrigavam aves de 35 a 59 semanas de idade.

Nas granjas de frangos procedia-se da mesma maneira. Os suabes ficavam sob responsabilidade da equipe técnica que fazia a coleta durante as visitas de rotina. O suabe era repassado ao encarregado do galpão que o arrastava da mesma forma que nos galpões de matrizes. Após a coleta as amostras eram enviadas ao laboratório, sob refrigeração. As camas de frangos eram predominantemente de 2º criada, sendo apenas a coleta da sexta semana de cama nova, ou de 1º criada. Os frangos encontravam-se com idades variando de 31 a 41 dias.

No laboratório o material era cadastrado de acordo com a origem e codificado. As amostras eram assepticamente retiradas dos sacos plásticos e colocadas em frascos de vidro de boca larga e tampa rosqueada de 500 ml de capacidade, contendo 100 ml de caldo tetracionato (TT). Estes frascos foram incubados a temperatura de 42°C por 24 e 48 h (MALLINSON & SNOEYENBOS, 1989b).

#### 4.1.2 Embriões de ovos bicados.

Foram coletados 93 ovos bicados no incubatório durante o experimento. Esses ovos eram selecionados do resíduo das bandejas dos nascedouros, que apresentavam o embrião ainda vivo. Após a coleta dos ovos o encarregado observava a qual lote de

matrizes estes pertenciam e determinava a coleta da cama do galpão correspondente. As matrizes estavam com idades entre 30 e 59 semanas.

No laboratório os embriões eram retirados dos ovos com a ajuda de pinças e tesouras estéreis. Fazia-se uma incisão abdominal no embrião e, com um suabe de algodão estéril coletavam-se assepticamente amostras do saco da gema. O suabe era colocado em tubos de ensaio com tampa rosqueável contendo 10 ml de água tamponada peptonada a 1% (BPW) e incubado por 24 horas a temperatura de 37°C como pré-enriquecimento para o isolamento inicial de salmonela. Cada embrião coletado era analisado individualmente.

#### 4.1.3 Rações e matérias primas de origem animal

Foram analisadas 57 amostras de rações, sendo 16 para matrizes e 41 para frangos. As rações eram provenientes da fábrica da empresa e as coletas feitas pelo funcionário encarregado do misturador. As rações eram codificadas como: RAI, RAT1 e RAT2 para frangos e 2600 e 4300 para matrizes. Estes dados eram utilizados, também, para a identificação das amostras no laboratório.

Das farinhas de origem animal, utilizadas na fabricação das rações, foram analisadas 40 amostras de farinha de carne, 26 de farinha de vísceras e 33 de farinha de penas. A coleta era realizada na plataforma de desembarque da fábrica de rações. A farinha de carne era proveniente de vários fornecedores. As farinhas de vísceras e penas eram procedentes do abatedouro de aves da própria empresa. As amostras, num peso aproximado de 200 g, eram coletadas em sacos plásticos estéreis.

No laboratório as amostras foram codificadas e pesadas em porções de 25 g e depositadas em frascos de boca larga contendo 225 ml de BPW a 1%. Eram então incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 h, como pré-enriquecimento para o isolamento inicial de salmonela.

#### 4.1.4. Águas do abatedouro e carcaças de frangos

Foram coletadas amostras de água dos tanques de escaldagem e de pré-resfriamento, sendo 19 de escaldagem e 15 de pré-resfriamento.

4.1.4.1. Coleta de amostras dos tanques de escaldagem e de pré-resfriamento. A coleta de amostras era feita, semanalmente, com o auxílio de uma almofada de gaze que era mantida dentro do tanque por três a quatro horas, presa por um barbante. A técnica foi adaptada de FERREIRA (1976) e a almofada era confeccionada dobrando-se várias vezes uma gaze de 8x8cm até o peso de 7,5 g e amarrada, ao meio, por um barbante de aproximadamente 2 m. Cortava-se outro quadrado duplo de gaze no mesmo tamanho e cobria-se a almofada dando-lhe formato de esfera. O barbante que saía do centro era então passado elípticamente várias vezes, consolidando e firmando o formato, arrematando-se por um nó único. Embalava-se individualmente e esterilizava-se a 121°C, 15 lb por 15 min.

Na indústria, as almofadas eram retiradas da embalagem e imediatamente mergulhadas nos respectivos tanques sendo presas às bordas pelo barbante. Foram utilizadas duas almofadas para cada tanque, colocando uma próxima a entrada e a outra próxima a saída das carcaças. Foram monitoradas as temperaturas do tanque na colocação e retirada dos suabes.

Após o tempo de permanência as amostras eram retiradas e colocadas em um frasco de boca larga contendo 100 ml de BPW a 1% estéril e mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório, onde após identificadas e codificadas eram colocadas em estufa para incubação a 37°C, por 24 horas.

4.1.4.2 Coleta de amostra de carcaças de frangos. Utilizou-se a técnica do enxágüe (D Aoust et alii, 1982). Semanalmente era feita a amostragem, num total de 97 amostras. As carcaças eram retiradas da linha de industrialização após a embalagem e levadas para o laboratório da empresa onde eram rotuladas e pesadas. A seguir eram retiradas assepticamente da embalagem, transferidas para sacos plásticos estéreis contendo 300 ml de BPW 1% e enxaguadas vigorosamente por cerca de 30 segundos. A água de enxágüe era devolvida então a um frasco de boca larga no qual o meio havia sido

esterilizado e este mantido sob refrigeração até o envio ao laboratório da UNICAMP. Esse tempo normalmente era de 3-4 horas.

No laboratório as amostras eram identificadas por códigos específicos e registradas as anotações de data de coleta e peso das carcaças.

## **4.2. MÉTODOS**

As amostras de camas de aviários, incubatório e abatedouro eram, sempre, coletadas e enviadas ao laboratório para análise no mesmo dia. As rações e matérias primas eram armazenadas durante a semana anterior e enviadas para análise na semana seguinte.

Os dados pertinentes a cada amostra eram convenientemente anotados.

### **4.2.1. Procedimento para isolamento de salmonelas**

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). As modificações do método: meios, temperaturas e tempos de incubação, quando existentes, foram apontadas na amostragem do material. Duas variações do método foram comparadas na capacidade de isolamento de um maior número de sorotipos.

4.2.1.1. Pré-enriquecimento. Foi utilizada a água tamponada peptonada (BPW) a 1% e incubação da amostra por 18-24h na temperatura de 37°C, como pré-enriquecimento para o isolamento inicial de salmonela.

4.2.1.2. Enriquecimento seletivo: Foi utilizado somente caldo tetrionato (TT). Uma alíquota de 1 ml de amostra pré-enriquecida era adicionada em 10 ml de caldo tetrionato e este incubado por mais 18-24h a 43°C antes de se fazer o plaqueamento em ágar seletivo. Foi também utilizado um procedimento de enriquecimento retardado, descrito como forma de aumentar as chances de isolamento de salmonelas, que consistiu no seguinte (WALTMAN et alii, 1991): a amostra original em caldo TT, após o período inicial de 18-24 h de incubação e após semeadura, era mantida em temperatura ambiente por mais cinco a sete dias. Findo este prazo, nova alíquota de 1 ml era transferida para novo tubo contendo 10 ml de caldo TT e novamente incubada por 18-24 h a 43°C para novo plaqueamento em ágar seletivo. Esta técnica foi utilizada para todas as amostras.

4.2.1.3. Plaqueamento em ágar seletivo. Foram utilizados dois tipos de ágar: ágar verde-brilhante, de alta seletividade, onde se adicionava 20 mg/ml do meio de novobiocina (MALLINSON, 1990); e o ágar Hektoen Entérico (HE) de média seletividade (EWING, 1986). A escolha decorreu do tipo de amostras que seriam trabalhadas, altamente contaminadas por outras enterobactérias. Após o período de incubação, o tubo de caldo TT era levemente agitado e retirada um alçada do caldo para plaqueamento em estrias de esgotamento nas placas de petri contendo os ágar seletivos. As placas eram então, incubadas por 18-24h em estufa bacteriológica a 37°C.

4.2.1.4. 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). A inoculação era feita através de picada central e estriamento sobre a 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.

4.2.1.5. Identificação bioquímica. Para os testes bioquímicos foram utilizadas as provas de indol, urease, citrato, malonato, decarboxilação da lisina e ornitina e fermentação do dulcitol, com semeaduras a partir do crescimento suspeito nos tubos de

TSI e LIA. O teste de hidrólise da uréia era feito inoculando-se duas a três alçadas da cultura em tubos contendo caldo uréia que era incubado por até 48h a 35°C. A reação positiva era indicada pela mudança da cor do meio de amarela para rosa. O teste de Indol (habilidade do microorganismo em desdobrar triptofano) foi feito com leve inoculação em caldo para indol, incubação a 35° C e leitura após a adição do reagente de Kovacs indicado pelo aparecimento de um anel avermelhado na camada superior alcoólica do tubo. No teste negativo o anel era amarelado. Para o teste de decarboxilação da lisina e ornitina os meios eram inoculados e tamponados com uma camada de aproximadamente 1 ml de óleo mineral estéril antes da incubação a 35° C para observação dos resultados por até quatro dias. Foi utilizado tubo controle negativo para os aminoácidos. O teste da utilização do citrato como única fonte de carbono era feito com inoculação leve sobre a superfície inclinada do meio e incubação a 35° C, com leitura em 24 e 72h. O teste positivo era indicado pelo crescimento do microorganismo que alterava a coloração da superfície inoculada de verde para azul. Para determinar a habilidade do microorganismo em utilizar malonato de sódio como única fonte de carbono foi utilizado inóculo leve e incubação em 24-48h em estufa a 35° C. O resultado positivo era revelado pela alteração na coloração do meio de verde para azul. A fermentação do dulcitol foi feita em meio líquido com indicador de pH.

4.2.1.6 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 Setor de Enterobactérias do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para a identificação sorológica e tipificação.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Amostragem utilizada no experimento

Durante 10 semanas de avaliação, foram analisadas um total de 454 amostras (Tab.1). Foram 40 amostras de farinha de carne, 33 de farinha de penas e 26 de farinha de vísceras; 97 amostras de carcaça de frango; 93 de embriões de ovos bicados, 19 amostras de água de tanque de escaldagem e 15 de tanque de resfriamento; 38 amostras de cama de matrizes e 36 de cama de frangos; 16 de ração de matrizes e 41 de ração de frangos.

Tabela 1. Amostragem por ponto e total, utilizada para a pesquisa de salmonelas numa empresa integradora de frangos de corte num período de 10 semanas.

AMOSTRAS	SEMANAS										TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Farinha carne	5	4	3	7	7	-	3	6	5	-	40
Farinha penas	-	6	3	3	2	1	3	5	5	5	33
Farinha vísceras	-	6	3	3	2	1	2	1	4	4	26
Carcaça	10	10	10	10	10	10	7	10	10	10	97
Ovos bicados	10	11	10	10	10	15	13	-	-	14	93
Água escaldagem	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	19
água pré-resfriamento	-	2	1	1	2	2	2	1	2	2	15
Cama matrizes	4	4	4	4	4	4	2	4	4	4	38
Cama frangos	4	4	4	-	4	4	4	4	4	4	36
Ração matrizes	-	-	3	2	1	2	2	4	2	-	16
Ração frangos	-	-	5	6	2	6	6	8	4	4	41
<b>TOTAL</b>	<b>34</b>	<b>49</b>	<b>48</b>	<b>48</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>46</b>	<b>45</b>	<b>42</b>	<b>49</b>	<b>454</b>

As amostras positivas foram 91, sendo 22 provenientes de farinha de carne, 16 de farinha de penas, 12 de farinha de vísceras, 21 de carcaça de frangos, 6 de água de pré-resfriamento, 4 de embriões de ovos bicados e ração de matrizes, 3 de ração de frangos, 2 de camas de matrizes e 1 de cama de frangos. Isolaram-se 520 cepas de salmonelas para tipificação, sendo 181 provenientes de farinha de carne, 87 de farinha de penas, 80 de farinhas de vísceras, 55 de carcaça de frango industrializada, 36 de ração de matrizes, 31 de água de tanque de pré-resfriamento, 29 de rações de frango, 15 de resíduos de incubatório (ovos bicados), 5 de cama de matrizes e 1 de cama de frangos (Tab.2).

Foram identificados 24 sorotipos nestas 520 cepas tipificadas, sendo 17 em farinha de carne, 12 em carcaça industrializada, 8 em farinha de penas e vísceras, 6 em água de resfriamento, 4 em rações de matrizes e frangos, 3 em cama de matrizes, 1 em ovos bicados e 1 em cama de frango (Tab.2).

Tabela 2. Número de amostras positivas para salmonela por tipo de material amostrado,, número de isolamentos e quantidade de sorotipos isolados.

<b>Material amostrado</b>	<b>Amostras positivas</b>	<b>Número de Isolamentos</b>	<b>Sorotipos isolados</b>
Farinha de carne	22	181	17
Farinha de penas	16	87	8
Farinha de vísceras	12	80	8
Ovos bicados	4	15	1
Água pré-resfriamento	6	31	6
Ração matrizes	4	36	4
Ração frangos	3	29	4
Carcaça frangos	21	55	12
Cama matrizes	2	5	3
Cama frangos	1	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>91</b>	<b>520</b>	<b>24</b>

## 5.2. Salmonelas em camas de matrizes e de frangos

Das 74 amostras de camas analisadas, 38 de matrizes e 36 de frangos, três foram positivas para salmonelas (Tab.3).

Tabela 3. Presença de salmonelas em amostras de camas de galpões de uma empresa integradora de frangos de corte.

Amostras	Sorotipos isolados	Número de isolamentos	Amostras positivas / total examinado	
			Nº	%
Cama matrizes	<i>S. typhimurium</i>	(2)	2/38	5,3
	<i>S. adelaide</i>	(2)		
	<i>S. I 1,4,5,12:i-</i>	(1)		
Cama frangos	<i>S. tennessee</i>	(1)	1/36	2,8
<b>TOTAL</b>	-	<b>(6)</b>	<b>3/74</b>	<b>4,1</b>

As camas de aves são o melhor indicativo de contaminação do lote (OLESIUK et alii, 1964). As taxas de isolamento são dependentes de vários fatores entre eles o período de utilização da cama, ou seja, a quantidade de lotes que ela já tenha abrigado (FANELLI et alii, 1970; JONES, 1991). Também são determinantes no isolamento a idade das aves, mais susceptíveis nos primeiros 10 dias de vida e a contaminação ambiental da granja (JONES et alii, 1991b). Neste trabalho registramos índices de 5,3% para cama de matrizes e 2,8% para cama de frangos respectivamente, resultados esperados, provavelmente devido ao fato de as camas serem predominantemente já utilizadas e a idade das aves encontrar-se fora do período de maior risco de infecção.

## 5.3. Salmonelas em embriões de ovos bicados

Das 93 amostras de embriões de ovos bicados analisadas, quatro foram positivas para salmonelas (Tab.4).

Tabela 4. Presença de salmonelas em amostras de embriões de ovos bicados de uma empresa integradora de frangos de corte.

Amostras	Sorotipos isolados	Número de isolamentos	Amostras positivas / total examinado	
			Nº	%
Ovos bicados	<i>S. typhimurium</i>	(15)	4/93	4,3

O índice de 4,3% de positividade encontrado nas amostras de ovos bicados são comparáveis aos de BHATIA et alii (1979) de 6,6%. Apesar dos isolamentos terem sido feitos apenas em uma das dez semanas de experimento demonstra-se que por esta via os indivíduos infectados continuam o ciclo de colonização dos lotes em que irão ser alojados, uma vez que as reprodutoras contaminadas continuam fornecendo diariamente ovos contaminados para a incubação.

BHATIA & McNABB (1980) investigaram a disseminação da infecção por salmonela em penugens e mecônio do incubatório, carcaças no abatedouro e rações e camas das granjas. Os mesmos sorotipos estavam envolvidos nas diferentes fases e só as rações peletizadas não foram consideradas importantes fontes de infecção.

#### 5.4. Salmonelas em rações e matérias primas de origem animal

##### 5.4.1. Rações

Das rações, quatro e três amostras foram positivas para salmonelas em 16 e 41 amostras de matrizes e frangos, respectivamente (Tab.5).

Tabela 5. Presença de salmonelas em amostras de rações de uma empresa integradora de frangos de corte.

Amostras	Sorotipos isolados	Número de isolamentos	Amostras positivas/total examinado	
			Nº	%
Ração matrizes	<i>S. havana</i>	(4)	4/16	25,0
	<i>S. senftenberg</i>	(2)		
	<i>S. montevideo</i>	(14)		
	<i>S. cerro</i>	(160)		
Ração frangos	<i>S. havana</i>	(2)	3/41	7,3
	<i>S. senftenberg</i>	(3)		
	<i>S. schwarzengrund</i>	(20)		
	<i>S. sp cepa rugosa</i>	(4)		
<b>TOTAL RAÇÕES</b>		<b>(65)</b>	<b>7/57</b>	<b>12,3</b>

As rações de matrizes tiveram um índice de 25% de positividade e as rações de frango 7,3%. Estes percentuais são dependentes de inúmeros fatores que vão desde o monitoramento da fábrica de ração, ao tipo produzido, transporte, armazenamento na granja e forma de apresentação às aves (HACKING, 1977; GABIS, 1991).

JONES et alii (1991a) 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%. No entanto estes autores citam BLANKENSHIP et alii (1984) que condicionam à redução da contaminação a umidade da ração, tempo e temperatura de armazenamento, número de salmonelas presente, eficiência da transferência de calor e umidade no processo e a resistência térmica da cepa envolvida.

BERCHIERI Jr. et alii (1992) encontraram no Brasil, média de 10% de contaminação em rações no estudo de quatro fábricas, no entanto os autores não esclarecem o tipo amostrado. No presente trabalho, a maioria das amostras de rações

não eram peletizadas e portanto não foram separadas na estatística final algumas amostras que eventualmente vieram com esse processamento. Isto decorreu por motivos técnicos da fábrica de ração da empresa de integração onde foi desenvolvida a pesquisa.

Hoje a recomendação nos EUA é que seja utilizada apenas ração peletizada para alimentação de matrizes e que os sub-produtos de origem animal quando adicionados sejam comprovadamente livres de salmonelas (NAGARAJA et alii, 1991).

#### 5.4.2. Matérias-primas de origem animal

Foram utilizadas 99 amostras de farinhas de origem animal utilizadas na fabricação das rações (Tab.6).

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 (MACKENZIE & BAINS, 1976; GABIS, 1991; JONES et alii, 1991a). O problema é normalmente devido às más condições de operação das graxarias em abatedouros, onde, assim que a farinha sai do autoclave é rapidamente contaminada pelo ambiente. As amostras de farinhas tiveram os índices mais altos de contaminação entre todas as amostras testadas: 55,0%, 48,5% e 46,2% para farinha de carne, penas e vísceras respectivamente. Esses percentuais de contaminação encontrados na pesquisa são concordantes com vários pesquisadores que citam taxas de contaminação de 39% para farinha de carne, 63% para farinha de pena e vísceras, 16% para farinha de penas e 33% para vísceras (BERCHIERI Jr et alii, 1984); e 60% e 50% respectivamente, em farinha de carne e farinha de ossos (JONES et alii, 1991a e GABIS, 1991).

Tabela 6. Presença de salmonelas em amostras de farinhas de origem animal utilizadas na fabricação de rações de uma empresa integradora de frangos de corte.

Amostras	Sorotipos isolados	Número de isolamentos	Amostras positivas/total examinado	
			Nº	%
Farinha carne	<i>S. senftenberg</i>	(29)	22 / 40	55,0
	<i>S. rissen</i>	(28)		
	<i>S. mbandaka</i>	(19)		
	<i>S. ohio</i>	(19)		
	<i>S. pomona</i>	(19)		
	<i>S. havana</i>	(17)		
	<i>S. montevideo</i>	(15)		
	<i>S. cerro atípica</i>	(12)		
	<i>S. I 1,4,5,12:i:-</i>	(7)		
	<i>S. orion</i>	(4)		
	<i>S. cerro</i>	(4)		
	<i>S. typhimurium</i>	(3)		
	<i>S. agona</i>	(1)		
	<i>S. alachua</i>	(1)		
	<i>S. meleagridis</i>	(1)		
<i>S. livingstone</i>	(1)			
<i>S. cepa rugosa</i>	(1)			
Farinha penas	<i>S. havana</i>	(54)	6/33	48,5
	<i>S. tennessee</i>	(11)		
	<i>S. anatum</i>	(7)		
	<i>S. senftenberg</i>	(6)		
	<i>S. montevideo</i>	(3)		
	<i>S. agona</i>	(3)		
	<i>S. cerro</i>	(2)		
	<i>S. ohio</i>	(1)		
	<i>S. minesota</i>	(1)		
Farinha vísceras	<i>S. havana</i>	(11)	12/26	46,2
	<i>S. tennessee</i>	(43)		
	<i>S. senftenberg</i>	(10)		
	<i>S. montevideo</i>	(7)		
	<i>S. I 1,3,19:-:-</i>	(4)		
	<i>S. I 1,3,15,19:y:-</i>	(2)		
<b>Total farinhas</b>	-	<b>(348)</b>	<b>52/99</b>	<b>52,5</b>

## 5.5 Salmonelas em águas do abatedouro e carcaças de frangos

Foram analisadas 34 amostras de águas do abatedouro sendo 19 do tanque de escaldagem e 15 do tanque de pré-resfriamento de carcaças e 97 amostras de carcaças embaladas e prontas para a comercialização (Tab.7).

Tabela 7. Presença de salmonelas em amostras de águas do abatedouro e em carcaças de uma empresa integradora de frangos de corte.

Amostras	Sorotipos isolados	Número de isolamentos	Amostras positivas/total examinado	
			Nº	%
Água escaldagem		(0)	0 / 19	0,0
Água de pré-resfriamento	<i>S. minnesota</i>	(12)	6 / 15	40,0
	<i>S. adelaide</i>	(9)		
	<i>S. typhimurium</i>	(6)		
	<i>S. mbandaka</i>	(2)		
	<i>S. agona</i>	(1)		
	<i>S. I 4,5,12:i:-</i>	(1)		
Carcaças	<i>S. schwarzengrund</i>	(20)	21 / 97	21,6
	<i>S. typhimurium</i>	(10)		
	<i>S. agona</i>	(5)		
	<i>S. alachua</i>	(5)		
	<i>S. havana</i>	(3)		
	<i>S. cerro</i>	(3)		
	<i>S. rissen</i>	(2)		
	<i>S. tennessee</i>	(2)		
	<i>S. mbandaka</i>	(2)		
	<i>S. orion</i>	(1)		
	<i>S. I 4,5,12:-:-</i>	(1)		
<b>Total</b>	-	<b>(86)</b>	<b>27 / 131</b>	<b>20,6</b>

As amostras de água do tanque de pré-resfriamento tiveram 40% de positividade. Não foi encontrada salmonela em água de tanque de escaldagem (Tab.7). A contaminação da água de resfriamento é um grande problema no abatedouro. LILLARD (1990) através de monitoramento em várias fases do processamento, demonstrou que a imersão no tanque de pré-resfriamento pode ser o ponto mais significativo de contaminação cruzada nas plantas de abate. As aves chegam contaminadas através da pele (externamente) ou devido a etapa de evisceração (contaminação interna) e na imersão desprendem os resíduos do abate na água. Os índices de isolamento desta etapa são muito diferentes entre os estudos de vários autores (SHACKELFORD, 1988). Esta variação é dependente, entre outros motivos, de cuidados de sanitização na indústria, grau de contaminação externa e interna do lote, utilização ou não de medidas adicionais no resfriamento como aditivos à água e a própria taxa de reposição de água no tanque. Em nosso trabalho o não isolamento de patógenos no tanque de escaldagem provavelmente deveu-se a temperatura mantida nos tanques da indústria, a qual nunca foi inferior a 58 °C, ficando em média em torno de 60 °C (Tab.8), resultado semelhante a MULDER et alii (1978).

Tabela 8. Temperaturas (° c) do tanque de escaldagem durante o experimento no período de coleta das amostras para pesquisa de salmonela.

Temperaturas	Semanas de coleta									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inicial	58,5	61,3	62,0	61,2	61,4	60,4	60,7	60,0	58,4	61,6
Final	58,0	58,6	59,7	61,9	61,5	60,3	60,8	58,8	60,7	59,7
<b>Média</b>	<b>58,3</b>	<b>59,9</b>	<b>60,9</b>	<b>61,6</b>	<b>61,5</b>	<b>60,4</b>	<b>60,8</b>	<b>59,4</b>	<b>59,6</b>	<b>60,3</b>

A taxa de contaminação do produto final, carcaças embaladas comercialmente, é extremamente variável. MORRIS & WELLS (1970) e CAMPBELL et alii (1983) encontraram 14,2 e 11,6% respectivamente, taxas menores que os 21,6% da presente pesquisa e 21,4% de JONES et alii (1991a). Porém, RENGEL & MENDOZA (1984) com 91% e INFANTE et alii (1992) com 32% na Venezuela; BERNARDO & MACHADO (1989) com 55% em Portugal; BAILEY et alii (1991) com 65% e MCBRIDE et alii (1980) com 96,2%, descrevem taxas muito superiores de positividade para salmonelas em carcaças.

Segundo os autores, os fatores que explicariam a variabilidade dos índices são: procedência do lote (contaminação inicial), condições higienico-sanitárias nos abatedouros (áreas físicas e manipuladores), contaminações cruzadas principalmente nas áreas de depenagem, resfriamento de carcaças e embalagem. IZAT et alii (1991) relacionam ainda o número de enxágües à taxa de recuperação de salmonelas, sugerindo que apenas uma parte é recuperada, pois os organismos já estão firmemente fixados na pele antes do processamento. SOERJADI-LIEM & CUMMING, (1984) e JONES et alii (1991b) citam ainda a estação do ano como fator diferencial, sendo que os meses quentes ajudariam o aumento destas taxas.

#### 5.6. Sorotipos identificados nas diferentes amostras

Entre os 24 sorotipos isolados o mais freqüente foi *Salmonella* havana, predominantemente em farinhas de origem animal (Tab.9) Foi encontrado também em rações de matrizes e frangos e em carcaças, demonstrando sua distribuição dentro do ciclo de produção.

A *Salmonella* *senftenberg* segundo sorotipo mais isolado e a de maior prevalência entre farinhas de carne, é também o sorotipo mais isolado em Portugal, segundo CRUZ et alii (1992), onde taxas de 11,95% de positividade foram encontradas em componentes de rações de origem animal.

A *Salmonella* *thiphimurium* aparece em quinto lugar em isolamentos e foi detectada em farinha de carne, água de tanque de pré-resfriamento, carcaças e cama de matrizes, porém, é a única isolada em embriões de ovos bicados, indicando sua transmissão via vertical, caracterizando contaminação do plantel e conseqüentemente a dificuldade de controle dentro do sistema de integração. BERCHIERI Jr et alii (1987) investigando a contaminação por Salmonelas em um abatedouro avícola encontraram *Salmonella* *thiphimurium* como o sorotipo mais frequentemente isolado, como também HUMBERT et alii, (1992) a citam como o sorotipo mais comumente isolado em sistemas de produção de frangos.

Tabela 9 - Quantidade de sorotipos isolados por tipo de amostra.

SOROTIPO	Fari- nha carne	Fari- nha penas	Far. vis- ceras	Carca- ças	Ovos bica- dos	Água pré- resfr.	Cama ma- trizes	Cama fran- gos	Ração ma- trizes	Ração fran- gos	TOTAL
Havana	17	54	43	3	-	-	-	-	4	2	123
Senftenberg	29	6	10	-	-	-	-	-	2	3	50
Schwarzengrund	-	-	-	20	-	-	-	-	-	20	40
Montevideo	15	3	7	-	-	-	-	-	14	-	39
Typhimurium	3	-	-	10	15	6	2	-	-	-	36
Rissen	28	-	-	2	-	-	-	-	-	-	30
Tennessee	-	11	11	2	-	-	-	1	-	-	25
Cerro	4	2	-	3	-	-	-	-	16	-	25
Mbandaka	19	-	-	2	-	2	-	-	-	-	23
Ohio	19	1	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Pomona	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19
Adelaide	-	-	2	-	-	9	2	-	-	-	13
Minnesota	-	1	-	-	-	12	-	-	-	-	13
Cerro atípica	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
Agona	1	3	-	5	-	1	-	-	-	-	10
I 4,5,12:-:-	7	-	-	1	-	1	1	-	-	-	10
Anatum	-	7	1	-	-	-	-	-	-	-	8
Alachua	1	-	-	5	-	-	-	-	-	-	6
sp cepa rugosa	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5
Orion	4	-	-	1	-	-	-	-	-	-	5
I 1,3,19:-:-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4
I 1,3,15,19:y:-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2
Meleagridis	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Livingstone	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>TOTAL</b>	<b>181</b>	<b>87</b>	<b>80</b>	<b>55</b>	<b>15</b>	<b>31</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>36</b>	<b>29</b>	<b>520</b>

A maior diversidade de sorotipos isolados de carcaças embaladas quando comparadas aos isolados de água de tanque de pré-resfriamento demonstram que após esta etapa novas fontes de contaminação estão implicadas no processo, provavelmente equipamentos ou manipuladores.

O sorotipo mais isolado em carcaças foi *Salmonella schwarzengrund*, sendo também o sorotipo predominante em ração de frangos e aparecendo somente nestes dois tipos de amostras, demonstrando que a fonte de infecção deve estar ou na fábrica de rações ou nas granjas. Na Venezuela e em Portugal ( INFANTE et alii, 1992; BERNARDO & MACHADO, 1989) o sorotipo predominante em carcaças foi a *Salmonella enteritidis*. A *Salmonella enteritidis* é hoje em alguns países o principal sorotipo isolado de produtos avícolas e amostras clínicas de pacientes com gastroenterites devido a surtos alimentares (BERNARDO & MACHADO, 1989; OPTIZ, 1992). Em nosso trabalho não foi detectado o sorotipo *Salmonella enteritidis*.

Com relação ao número de sorotipos isolados por amostras encontrou-se a grande maioria, 57,1% com apenas 1 sorotipo, 30,7% com 2 sorotipos, 9,9% com 3 sorotipos e 2,2% com 4 sorotipos (Tab.10). As 2 amostras com quatro sorotipos foram de farinha de carne e farinha de vísceras e das 9 amostras com 3 sorotipos, 6 são de farinha de carne, 2 de farinha de vísceras e 1 de carcaças. Estes resultados são semelhantes aos resultados de BERCHIERI Jr et alii (1992), que encontraram até 3 sorotipos na mesma amostra.

Tabela 10. Número de sorotipos identificados por amostra.

Amostras	Número de sorotipos				Total
	1	2	3	4	
Farinha de carne	8	7	6	1	22
Farinha de penas	9	7	-	-	16
Farinha de vísceras	5	4	2	1	12
Água de pré-resfriamento	3	3	-	-	6
Ração de matrizes	3	1	-	-	4
Ração de frangos	1	2	-	-	3
Carcaça de frangos	17	3	1	-	21
Cama de matrizes	1	1	-	-	2
Cama de frangos	1	-	-	-	1
Ovos bicados	4	-	-	-	4
<b>TOTAL</b>	<b>52</b>	<b>28</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>91</b>
<b>(%)</b>	<b>(57,1)</b>	<b>(30,7)</b>	<b>(9,9)</b>	<b>(2,2)</b>	

## 5.7. Resultados obtidos com as modificações do método de enriquecimento seletivo

O efeito do tempo de incubação do meio tetracionato de enriquecimento sobre o isolamento de salmonelas nos diferentes tipos de amostras e durante as 10 semanas do experimento pode ser observado nas Tabs. 11 e 12.

Tabela 11. Número de amostras positivas para o isolamento de salmonelas nas diferentes semanas de trabalho, utilizando o meio de enriquecimento incubado em diferentes tempos.

Semana	Nº amostras positivas	Períodos de incubação		
		24h	48h	TER*
1	5	2	2	4
2	11	6	4	8
3	12	7	6	10
4	14	6	11	15
5	6	5	5	6
6	1	1	1	1
7	6	1	3	5
8	6	4	8	5
9	13	3	10	12
10	11	6	7	8
<b>TOTAL</b>	<b>91</b>	<b>41</b>	<b>57</b>	<b>74</b>
<b>%</b>	<b>100</b>	<b>45,1</b>	<b>62,6</b>	<b>81,3</b>

\*TER: Técnica de enriquecimento retardado.

Com relação a taxa de isolamento de *Salmonella sp*, verificou-se que, normalmente os melhores resultados obtiveram-se com a utilização da TER, 81,3% das amostras totais positivas, sendo 62,6% positivas em 48 h e apenas 45,1% das amostras positivas em 24 h (Tab.11). Assim, na primeira semana enquanto em enriquecimento de 24 e 48 h na técnica convencional conseguiu-se 2 amostras positivas, com a TER isolou-se salmonela em 4 amostras. A TER foi mais eficiente também na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semanas, com 2, 3, 4, 1, 2, 2, e 1 amostras a mais respectivamente. Na 6<sup>a</sup> semana manteve-se igual em 1 amostra, sendo menos eficiente apenas na 8<sup>a</sup> semana, onde em 48h registrou-se 3 amostras isoladas a mais. Estes resultados ao fim de 10 semanas são

semelhantes aos encontrados por WALTMAN et alii (1991) que conseguiram em 464 isolamentos, 58% (269) de positividade em 24h e 91% (421) com a TER.

Tabela 12. Número de amostras positivas para salmonela, utilizando-se o meio de tetracionato em diferentes tempos de incubação e plaqueamento em dois tipos de ágar seletivos.

Amostras	Amostras positivas	Período de incubação		
		24h	48h	TER*
Cama de matrizes	2	1	1	0
Cama de frangos	1	0	1	0
Embrião de ovos bicados	4	1	2	2
Ração de matrizes	4	2	4	4
Ração de frangos	3	2	1	2
Farinha de carne	22	17	17	18
Farinha de penas	16	4	10	14
Farinha de vísceras	12	7	7	12
Água de escaldagem	-	-	-	-
Água de pré-resfriamento	6	2	5	5
Carcaça de frangos	21	5	9	17
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>41</b>	<b>57</b>	<b>74</b>

\*TER: Técnica de enriquecimento retardado

Os resultados obtidos entre os diferentes tipos de amostras não clínicas parecem indicar que a técnica de enriquecimento retardado (TER) é de grande valia para amostras bastante contaminadas como no caso das farinhas e carcaças, onde nitidamente foi mais eficiente.

O efeito do ágar seletivo sobre o isolamento de salmonelas pode ser observado na Tab.13.

Tabela 13. Número de isolamentos positivos para salmonela (N) em ágar BGN e HE a partir de amostras enriquecidas com caldo tetracionato, seu percentual (%) e número de isolamentos (n) em somente um dos ágar.

Amostras	Total de isolamentos	Ágar BGN			Ágar HE		
		N	%	n	N	%	n
Cama matrizes	5	4	80	1	1	20	1
Cama frangos	1	-	-	-	1	100	1
Ovos bicados	15	11	73,3	2	4	26,7	1
Ração matrizes	36	11	30,6	-	25	69,2	2
Ração frangos	29	8	27,6	-	21	72,4	2
Farinha de carne	181	55	30,4	1	126	69,6	3
Farinha de penas	87	33	38	1	54	62	3
Farinha de vísceras	80	25	31,3	1	55	68,7	3
Água escaldagem	-	-	-	-	-	-	-
Água pré-resfriamento	31	12	38,7	1	19	61,3	2
Carcaça de frangos	55	25	45,5	6	30	54,5	12
<b>TOTAL</b>	<b>520</b>	<b>184</b>	<b>35,4</b>	<b>13</b>	<b>336</b>	<b>64,6</b>	<b>30</b>

Apesar da grande prevalência do ágar HE (336 isolamentos) sobre o BGN (184) a necessidade do uso concomitante de dois ou mais ágar é importante já que em 43 isolamentos (8,3%) a salmonela foi isolada em apenas 1 dos ágar, sendo 13 (2,5%) apenas em BGN e 30 (5,8%) apenas em HE.

## 6. CONCLUSÕES

- 6.1. Os resultados positivos no isolamento de salmonela em quase todos os segmentos da empresa integradora demonstram a existência da contaminação através das várias fases de produção.
- 6.2. Todos os sorotipos isolados em rações de matrizes, rações de frangos (exceção para *Salmonella schwarzengrund*), camas de matrizes e camas de frangos foram também isolados em farinhas, demonstrando que a fábrica de rações é um importante ponto crítico nesta integração.
- 6.3. Nem todos os sorotipos encontrados nos diferentes segmentos da produção anteriores ao abate foram isolados em água do tanque de pré-resfriamento ou carcaças (11 sorotipos isolados das carcaças num total de 24 sorotipos) indicando falha na metodologia de isolamento ou ação de procedimentos sanitários na produção.
- 6.4. A temperatura da água de escaldagem como controle de contaminação aparentemente demonstrou eficácia, já que no presente trabalho não isolou-se salmonela desta fonte.
- 6.5. O isolamento de *Salmonella typhimurium* em embriões de ovos bicados, além de confirmar a contaminação do plantel de matrizes por este sorotipo, também isolado em camas, evidencia provavelmente sua maior facilidade em fazer a transmissão via ovo.
- 6.6. As ações de controle de salmonelas em uma empresa integradora de frangos de corte devem abranger vários segmentos, sendo as rações e matérias-primas utilizadas na sua fabricação pontos muito importantes na sua disseminação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS,W.H. A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of *Salmonella* in foods. **Food Technology**, march, p. 77-82, 1985.
- BAILEY,J.S. Integrated colonization control of *Salmonella* in poultry. **Poultry Science** v.67, n.6, p.928-932, 1988.
- BAILEY,J.S.; COX,N.A.; BLANKENSHIP,L.C. A comparison of an enzyme immunoassay, DNA hibridization, antibody immunobilization and conventional methods for recovery of naturally occurring Salmonellae from processed broiler carcasses. **Journal of Food Protection**. v.54, n.5, p.354-356, 1991.
- BAILEY,J.S.; COX,N.A.; CASON,J.A., BLANKENSHIP,L.C. Breeder flocks and hatcheries as critical control points for reduction of commensal colonization of broiler chickens. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Proceedings**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p. 258-264.
- BARROW,P.A. Salmonellosis in Poultry. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Proceedings**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p.141-163.
- BAYNE,H.G.; GARIBALDI,J.A.; LINEWEAVER,H. Heat resistance of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella senftenberg* 775W in chicken meat. **Poultry Science**. v.44,p.1281-1284,1965.
- BEATTIE,W.E. Avian infection with *Salmonella thompson* - observations. **Poultry Science**. v.39, p.1233, 1960.

- BERCHIERI Jr,A.; IRINO,K.; NEME,S.N.; PAULILLO,A.C.; CALZADA,C.R.; FERREIRA,S.A.;PESSÔA,G.V.A. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de ração. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.4, n.3, p.83-85, 1984.
- BERCHIERI Jr,A.; PAULILLO,A.C.; FERNANDES,S.A.; PESSÔA, G.V.A.; ROSSI Jr,O.D.; IRINO,K; ÁVILA,F.A.; CALZADA,C.T. *Salmonella* em um abatedouro avícola. **Ars Veterinária**. v.3, n.1, p.81-87, 1987.
- BERCHIERI Jr,A.; FERNANDES,S.A.; IRINO,K.; QUINTANA,J.L.; SANTOS,J.A. *Salmonella* in poultry feeds. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13.Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Proceedings**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p.113-117.
- BERNARDO,F.M.A.; MACHADO,J.C.C. Prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango em Portugal. Perspectiva epidemiológica em humanos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.489, n.84, p.31-45, 1989.
- BHATIA,T.R.S.; McNABB,G.D.; WYMAN,H.; NAYAR,G.P.S. *Salmonella* isolation from litter as an indicator of flock infection and carcass contamination. **Avian Diseases**. v.23, p.838-847, 1979.
- BHATIA,T.R.S.; McNABB,G.D. Dissemination of *Salmonella* in broiler chicken operations. **Avian Diseases**. v.24, p.616-624, 1980.
- CALDERON,D.F.; FURLANETTO,S.M.P. Isolamento de *Salmonella* em diferentes meios seletivos de enriquecimento, tempos e temperaturas de incubação. **Revista de Microbiologia**, v.22, n.2, p.127-130, 1991.
- CAMPBELL,D.F.; GREEN,S.S.; CUSTER,C.S.; JOHNSTON,R.W. Incidence of *Salmonella* in fresh dressed turkeys raised under *Salmonella* controlled and uncontrolled environments. **Poultry Science**. v.61, p.1962-1967, 1982.

- CAMPBELL,D.F.; JOHNSTON,R.W.; CAMPBELL,G.S.; McCLAIN,D.; MACALUSO,J.F.  
The microbiology of raw, eviscerated chickens: A ten year comparison. **Poultry Science**. v.62, p.437-444, 1983.
- CAMPBELL,D.F. JOHNSTON,R.W.; WHEELER,M.W.; NAGARAJA,K.V.; SZYMANSKI,C.D.; POMEROY,B.S. Effects of the evisceration and cooling processes on the incidence of *Salmonella* in fresh dressed turkeys grown under *Salmonella* - controlled and uncontrolled environments. **Poultry Science**. v.63, p.1069-1072, 1984.
- CORRIER,D.E. Salmonellae prevention ideas in broilers, broiler breeders. **Poultry Digest**. December, p. 12-15, 1990.
- COX,N.A.; MERCURY,A.J.; TANNER,D.A.; CARSON,M.O.; THOMSON,J.E; BAILEY,J.S. Effectiveness of sampling methods for salmonella detection on processed broilers. **Journal of Food Protection**. v.41, p.341-343, 1978.
- CRUZ,I.M.V.da; FERNANDES,I.; SOL,M. Incidence of *Salmonella* in different portuguese food products. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Posters**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p.141-142.
- D'AOUST,J.Y.; MAISHMENT,C. Preenrichment conditions for effective recovery of *Salmonella* in foods and feed ingredients. **Journal of Food Protection**. v.42, p.153-157, 1979.
- D'AOUST,J.Y. Update on preenrichment and selective enrichment conditions for detection of *Salmonella* in foods. **Journal of Food Protection**. v.44, n.5, p.369-374, 1981.
- D'AOUST,J.Y.; STOTLAND,P.; BOVILLE,A. Sampling methods for detection of *Salmonella* in raw chicken carcasses. **Journal of Food Science**. v.47, p.1643-1644,1729, 1982.

- D'AOUST, J.Y. Effective enrichment-plating conditions for detection of *Salmonella* in foods. **Journal of Food Protection**, v.47, n.8, p.588-590, 1984.
- DOUGHERTY, T.J. *Salmonella* contamination in a commercial poultry (broiler) processing operation. **Poultry Science**, v.53, p.814-821, 1974.
- DOUGHERTY, T.J. A study of *Salmonella* contamination in broiler flocks. **Poultry Science**, v.55, p.1811-1815, 1976.
- DOYLE, M.P.; CLIVER, O.D. *Salmonella*. In: CLIVER, O.D. **Foodborne Diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 185-204.
- DUBERT, W.H. Assessment of *Salmonella* contamination in poultry - past, present and future. **Poultry Science**. v.67, p.944-949, 1988.
- EWING, W.H. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**, 4<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier Science Publishing, 1986. 536p.
- FANELLI, M.J.; SADLER, W.W.; BROWNELL, J.R. Preliminary studies of persistence of *Salmonella* in poultry litter. **Avian Diseases**. v.14, p.131-141, 1970.
- FERREIRA, M.D. **Pesquisa de *Salmonella* em águas superficiais de Belo Horizonte**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 1976.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**, 6th ed., A.O.A.C., 1984.
- FORSYTHE, R.H.; ROSS, W.J.; AYRES, J.C. *Salmonella* recovery following gastro intestinal and ovarian inoculation in the domestic fowl. **Poultry Science**. v.46, p.848-855, 1967.

- FRICKER,C.R. A review the isolation of salmonellas and campylobacters. **Journal of Applied Bacteriology**. v.63, n.2, p.99-116, 1987.
- GABIS,D.A. Environmental factors affecting enteropathogens in feed and feed mills. In: BLANKENSHIP,L.C. ed. **Colonization Control of Human bacterial. Enterophatogens in Poultry**. Food Science and Technology. A series of monographs. San Diego: Academic Press, 1991. p. 23-27.
- GAUGER,H.C; GREAVES,R.E. Isolations of *Salmonella typhimurium* from drinking water in an infected environment. **Poultry Science**, v.25, p.476-478, 1948.
- GOYAL,S.M.; SINGH,I.P. Probable sources of samonellae on a poultry farm. **British Veterinary Journal**. v.126, p.180-184,1970.
- HACKING,W.C. Salmonella in feed and environment. In: BARNUM,D.A., ed. **Proceedings of International Symposium Salmonella and Prospects for Control**. Ontario, 1977. p.58-70.
- HAREIN,P.R.; DE LAS CASAS,E.; POMEROY,B.S.; YORK, M.D. Salmonella spp and serotypes of E. coli isolated from lesser meal worm collected from poultry brooder houses. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.63, p.80-82, 1970.
- HARVEY,R.W.S.; PRICE,T.H. Principles Salmonella isolation. **Journal of Applied Bacteriology**. v.46, p.27-56, 1979.
- HENKEN,A.M.; FRANKENA,K.; GOELEMA,J.O.; GRAAT,E.A.M.; NOORDHUIZEN,J.P.T.M. Multivariate epidemiological approach to salmonellosis in broiler breeder flocks. **Poultry Science**, v.71, p.838-843, 1991.
- HOBEN,D.A.; ASHTON,D.H.; PETERSON,A.C. Some observations on the incorporation of novobiocin into Hektoen enteric agar for improved Salmonella detection. **Applied Microbiology**. v.26,p.126-127, 1973.

- HUHTANEN,C.N.; NAGHSKI,J.; DELLAMONICA,E.S. Efficiency of *Salmonella* isolation from meat-and-bone meal of one 300g sample versus ten 30g samples. **Applied Microbiology**. v.23, p.688-692, 1972.
- HUMBERT,F.; BLIVET,D.; ERMEL,G.; GRIMONT,F. Molecular and epidemiological studies of *Salmonella typhimurium* in poultry flocks. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Comunication**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. 11 p.
- HUMPHREY,T.J. The effect of pH adjustment on the microbiology of chicken scald-tank water with particular reference to death rate of *Salmonellas*. **The Journal of Applied Bacteriology**. v.51, n.3, 517-527, 1981.
- INFANTE,D.; NOGUEIRA,C.de; LEON,A.J.; CATARI,M.; HERRERA,A. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses. . In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Posters**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p.120-121.
- IZAT,A.L.; YAMAGUCHI,W.; KANIAWATI,S.; MCGINNIS,J.P.; RAYMOND,S.G.; HIERHOLZER,R.E.; KOPEK,J.M. Research Note: Use of consecutive carcass rinses and a most probable number procedure to estimate salmonellae contamination of inoculated broilers. **Poultry Science**. v.70, p.1448-1451, 1991.
- JONES,F.T. Controlling *Salmonella* involves the hatchery, broiler housing, litter conditions, environment, and water and feed availability. **Poultry Digest**. January, p.24-26,28, 1991.
- JONES.F.T.; AXTELL,R.C.; RIVES,D.V.; SCHEIDELER,S.E.; TARVER Jr,F.R.; WALKER,K.L.; WINELAND,M.J. A survey of *Salmonella* contamination in modern broiler production. **Journal of Food Protection**. v.54, n.7, p.502-507,513, 1991a.
- JONES,F.T.; AXTELL,R.C.; TARVER,F.R.; RIVES,D.V.; SCHEIDELER,S.E; WINELAND,M.J. Environmental factors contributing to *Salmonella* colonization in

- chickens. In: BLANKENSHIP,L.C. ed. **Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry**. Food Science and Technology - A series of monographs. San Diego: Academic Press, 1991b. p.3-20.
- LAHELLEC,C.; COLIN,P.; BENNEJEAN,G. Influence of resident *Salmonella* on contamination of broiler flocks. **Poultry Science**, v.65, p. 2034-2039, 1986.
- LILLARD,H.S. The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. **Journal of Food Protection**. v.52, p.829-832, 1990.
- MACKENZIE,M.M.; BAINS,B.S. Dissemination of Salmonella serotypes from raw feed ingredients to chicken carcasses. **Poultry Science**. v.55, p.957-960, 1976.
- MALLINSON,E.T.; TATE,C.R.; MILLER,R.G.; BENNETT,B.; RUSSEK-COHEN,E. Monitoring poultry farms for Salmonella by drag-swab sampling and antigen-capture immunoassay. **Avian Diseases**. v.33, p.684-690, 1989a.
- MALLINSON,E.T.; SNOEYENBOS,G.H. Salmonellosis. In:PURCHASE,H.G., ed. **A Laboratory Manual for the Isolation and Identification on Avian pathogens**. 3<sup>rd</sup> ed. Iowa, Kendall/Hunt Publishing Company, 1989b. p.3-11. (American Association of Avian Pathologists).
- MALLINSON,E.T. Details: Key components used in simplified farm test for *Salmonella*. In: ANNUAL MEETING OF THE AVMA,127<sup>th</sup>. 1990, San Antonio. **Poster Supplement**. 1990. s.p.
- MASON,J.; EBEL,E. Report of current status of the United States Department of agriculture Salmonella Enteritidis control program. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Proceedings**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p. 312-318.

- MCBRIDE,G.B.; SKURA,B.J.; YADA,R.Y.; BOWMER,E.J. Relationship between incidence of Salmonella contamination among pre-scalded, eviscerated, and post-chilled chickens in a poultry processing plant. **Journal of Food Protection**. v.43, n.7, p.538-542, 1980.
- MOATS,W.A. Comparison of four agar plating media with and without added novobiocin for isolation of Salmonellae from beef and deboned poultry meat. **Applied Environmental Microbiology**. V.27, p.118-123, 1974.
- MOATS,W.A. Update on *Salmonella* in foods: selective plating media and other diagnostic media **Journal of Food Protection**. v.44, p.375-380, 1981.
- MORRIS,G.K.; AYRES,J.C. Incidence of salmonellae on commercially processed poultry. **Poultry Science**. v.39, p.1131-1135, 1960.
- MORRIS,G.K.; WELLS,J.G. *Salmonella* contamination in a poultry-processing plant. **Applied Microbiology**. v.19, n.5, p.795-799, 1970.
- MORRISON.G.J.; FLEET,G.H. Reduction of Salmonella on chicken carcasses by immersion treatments. **Journal of Food Protection**, v.48, n.11, p.939-943, 1985.
- MULDER,R.W.A.W.; DORRESTEIJN,L.W.J.; BROEK,van der J. Cross-contamination during the scalding and plucking of broilers. **British Poultry Science**, v.19, p.61-70, 1978.
- NAGARAJA,K.V.; POMEROY,B.S.; WILLIAMS,J.E. Paratyphoid infections. In: COLNEK,B.W.,ed. **Diseases of Poultry**. 3<sup>rd</sup> ed. Iowa State University Press, 1991. p.99-130.
- NIELSEN,B.B. Production of Salmonella-free poultry feed. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuç, sept. 1992. **Proceedings**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p. 436-441.

- NOTERMANS,S.; KAMPELMACHER,E.H.; VAN SCHOTHORST,M. Studies of different sampling methods for determination of bacterial counts from frozen broilers. **Journal of Applied Bacteriology**. v.32, p.329-337, 1975.
- NOTERMANS,S.H.W.; GIESSEN,A.W.VAN DE; OOSTEROM,J. Aspects of intervention measures to reduce human infections with *Salmonella*. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Proceedings**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p. 235-244.
- OLESIUK,O.M.; CARLSON,V.L.; SNOEYENBOS,G.H.; SMYSER,C.F. Experimental *Salmonella typhimurium* infection in two chicken flocks. **Avian Diseases**. v.13, p.500-508, 1969.
- OLESIUK,O.M.; SNOEYENBOS,G.H.; SMYSER,C.F. Inibitory effect of used litter on *Salmonella typhimurium* transmission in the chicken. **Avian Diseases**. v.15, p.118-24, 1971.
- OOSTEROM,J. Epidemiological studies and proposed preventive measures in the fight against human salmonellosis. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.41-52, 1991.
- OOSTEROM,J.; NOTERMANS,S. The concept of Salmonella transmission cycles: A historical perspective. In: CNEVA, 1992.
- OPARA,O.O.; MALLINSON,E.T.; TATE,C.R.; CARR,L.E.; MILLER,R.G.; STEWART,L.; KELLEHER,C.; JOHNSTON,R.W.; JOSEPH,S.W. The effect of exposure, storage times, and types of holding media on the drag-swab monitoring technique for Salmonella. **Avian Diseases**. v.36, p.63-68, 1992.
- OPTIZ,H.M. Progress being made in Salmonella enteritidis reduction on the farm. **Poultry Digest**. March, p.16-22, 1992.

- PERALES,I.; AUDICANA,A. Metodos para el aislamiento de *Salmonella*. **Alimentaria**. v.26, n.205, p.19-26, 1989.
- RENGEL,A.; MENDOZA,S.; Isolation of *Salmonella* from raw chicken in Venezuela. **Journal of Food Protection**. v.47, n.3, p.213-216, 1984.
- RIGBY,C.E.; PETTIT. J.R. Changes in the salmonella status of broiler chickens subjected to simulated shipping conditions. **Canadian Journal Comp. Medical**. v.44, p.374-381, 1980.
- ROBERTS,T.; Salmonellosis control: Estimated economic costs. **Poultry Science**. v.67, n.6, p.936-943, 1988.
- SCHACKELFORD,A.D. Modifications of processing methods to control *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**. v.67, n.6, p.933-935, 1988.
- SHARP,J.C.M.; REILLY,W.J.; MUNKO,D.S.; GIRDWOOD,R.W.A. Salmonellosis in Scotland - an integrated inter-disciplinary approach. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Proceedings**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p. 333-340.
- SHIVAPRASAD,H.L.; TIMONEY,J.F.; MORALES,S.; LUCIO,B.; BAKER, R.C. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, faecal shedding, and serological responses. **Avian Diseases**, v.34, p.548-557, 1990.
- SIMONSEN,B.; BRYAN,F.L.; CHRISTIAN,J.H.B.; ROBERTS,T.A.; TOMPKIN,R.B.; SILLIKER,J.H. Prevention and control of food-borne salmonellosis through applications on hazard analysis critical control points (HACCP). **International Journal of Food Microbiology**. v.4, p.227-247, 1987.
- SNOEYENBOS,G.H.; CARLSON,V.L.; MCKIE,B.A.; SMYSER,C.F. An epidemiological study of salmonellosis of chickens. **Avian Diseases**. v.11, p.653-657, 1967.

- SNOEYENBOS,G.H.; MCKIE,B.A.; SMYSER,C.F.; WESTON,C.R. Progress in identifying and maintaining Salmonella-free commercial chicken breeding flocks. **Avian Diseases**. v.14, p.683-696, 1970.
- SNOEYENBOS,G.H. An approach to identifying and maintaining salmonella-free chickens. **Avian Diseases**. v.15, n.1, p.28-31, 1971.
- SOERJADI-LIEM,A.S.; CUMMING,R.B. Studies on the incidence of *Salmonella* carriers in broiler flocks entering a poultry processing plant in Australia. **Poultry Science**. v.63, p.892- 895, 1984.
- SPECK,M.L., ed. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington,D.C.: American Public Health Association, 1984. 914p.
- STEELE,J.H. Food irradiation hygiene: Perception and reality Salmonella control. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Proceedings**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p. 450-456.
- SUPHABPHANT,W.; YORK,M.D.; POMEROY,B.S. Use of two vaccines (live 30D or Killed RW 16) in the prevention of *Salmonella typhimurium* infection in chickens. **Avian Diseases**. v.27, p.602-615, 1983.
- TODD,E.C.D. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. **Journal of Food Protection**. v.52, p.595-601, 1989.
- TURNBULL,P.C.B.; SNOEYENBOS,G.H. The roles of ammonia water activity and pH in the salmonellacidal effect of long-used poultry litter. **Avian Diseases**. v.17, n.1. p.72-86, 1973.

- WALTMAN,W.D.; HORNE,A.M.; PIRKLE,C.; DICKSON,T.G. Use of delayed secondary enrichment for the isolation of Salmonella in poultry and poultry environments. **Avian Diseases**. v.35, p.88-92, 1991.
- WIERUP,M.; ENGSTRÖM,B.; ENGUALL,A.; WAHLSTRÖM,H. Control of Salmonella in food producing animals in Sweden. In: **International Symposium on Salmonella and Salmonellosis**, 13. Ploufragan/Saint Brieuc, sept. 1992. **Proceedings**. World Veterinary Poultry Association. Guivarch, 1992. p. 386-398.
- WILLIAMS,J.E. Effect of high level formaldehyde fumigation on bacterial populations on the surface of chicken hatching eggs. **Avian Diseases**. v.14, p.386-392, 1970.
- WILLIAMS,J.E.; WHITTEMORE,A.D. Comparison of six methods of detecting *Salmonella typhimurium* infection of chickens. **Avian Diseases**. v.20, p.728-734, 976.
- WILLIAMS,J.E. Formalin destruction of salmonellae in poultry litter. **Poultry Science**. v.59, p.2717-2724, 1980.

## 8. APÊNDICE

### 8. 1. Leite Desnatado a 20%

Leite em pó desnatado (MOLICO).....	200 g
Água destilada.....	1 litro

O meio era dissolvido em água destilada previamente aquecida . Esterilizado a 121°C, 15 lb por 12 min.

### 8. 2. Água Tamponada Peptonada ( BPW) 1%

Os meios eram preparados na semana anterior ao emprego e armazenados em geladeira. A água tamponada peptonada era preparada segundo a fórmula:

Peptona .....	10,0 g
Cloreto de sódio ( NaCl).....	5,0 g
Fosfato de Sódio bibásico dodecahidratado ( Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) x 12 H <sub>2</sub> O .....	9,0 g
Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	1,5 g

Após dissolução em 1 litro de água destilada aquecida, ajustava-se o pH para 7,0 e distribuía-se nos frascos adequados a cada experimento.

### 8.3. Caldo Tetrionato

O caldo tetrionato era preparado no dia anterior ao emprego. Após pesagem e adição de água destilada era fervido por 10 minutos, levado à capela de fluxo laminar e transferido a frascos de boca larga estéreis, na quantidade de 100 ml para as amostras de camas de matrizes e de frangos e tubos de ensaio estéreis na quantidade de 10 ml para todos os outros tipos de amostras. No dia de uso era adicionado de solução de iodo na quantidade de 2ml para os frascos de 100 ml e 0,2 ml para os frascos de 10 ml.

#### 8.3.1. Solução estoque de iodo

Iodo.....	6,0 g
Iodeto de potássio.....	5,0 g
Água destilada.....	20,0 ml.

#### 8.4. Ágar Seletivos

Foram utilizados dois tipos de ágar seletivos, o Hektoen Enteric Agar ( HE ,Difco-0853) e o Brilliant Green Agar (BGA, Difco - 0285) acrescido de novobiocina (Sigma, N-1628 ) - BGN - .

Os meios eram pesados e preparados em frascos Erlenmeyer de 1 litro. Após a dissolução em água destilada o ágar BGA era autoclavado a 121° C, 15 lb, 15 min.

Após a saída do autoclave e em temperatura entre 45-50°C, os frascos de meio eram levados a capela de fluxo laminar para o plaqueamento, na quantidade de aproximadamente 20 ml por placa. O ágar verde brilhante era acrescido de 1 ml da solução estoque de novobiocina para cada litro de meio. As placas eram deixadas abertas no fluxo até sua secagem quando eram fechadas, acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em refrigeração até o momento do uso.

O ágar HE após a dissolução era fervido em bico de bunsen até ficar translúcido. Era então resfriado a 45-50°C para o plaqueamento no fluxo laminar e as placas secas também eram mantidas sob refrigeração até o emprego.

#### 8.4.1 Solução Estoque de Novobiocina ( MALLINSON, 1990b).

A solução estoque de Novobiocina contendo 20 mg/ml era preparada através da adição de 2,08 g do sal de novobiocina para 100 ml de água destilada. Este cálculo levou em conta o grau de pureza do produto.

Após a dissolução do sal em água, a solução era esterilizada através de filtro (Millipore, HAWP 025) e colocada em tubos estéreis de tampa rosqueável na quantidade de 5 ml por tubo. Os tubos foram então congelados e mantidos em freezer até o dia do uso.

#### 8.5. Ágar tríplíce Ferro (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA)

Utilizou-se dois meios de triagem, o ágar lisina ferro (LIA, Difco - 0849) e o ágar tríplíce ferro (TSI, Difco - 0265).

Os meios eram preparados conforme indicação do fabricante, acrescidos de água destilada. Eram então aquecidos até totalmente dissolvidos e transferidos para tubos de ensaio com tampa (13 x 100) na quantidade de aproximadamente 3 ml por tubo e autoclavados por a 121°C e 15 lb, 15 min. Após autoclavagem eram retirados e inclinados de forma que o fundo dos tubos de TSI ficassem com no mínimo 1,5 cm e os de LIA 3 cm. Após solidificação acondicionados em frascos e estocados sob refrigeração.

#### 8.6. Provas Bioquímicas

##### 8.6.1 Urease

Utilizou-se o caldo Uréia Broth ( Difco, 0272). O meio era preparado conforme instruções do fabricante e esterilizado por filtração ( Millipore, membranas de 0,45 $\mu$  de diâmetro de poro). Era entubado na quantidade de aproximadamente 2 ml por tubo e estocado sob refrigeração.

#### 8.6.2 Indol

Usou-se o caldo Triptofano ( Tryptone Difco, 0123), o qual era preparado conforme a fórmula:

Triptona .....	10 g
Água destilada.....	1,0 litro.

Entubado (tubos 13x100) na quantidade de aproximadamente 4 ml por tubo. Acondicionado e autoclavado a 121°C, 15 lb por 15 min. Estocado sob refrigeração até o momento de uso.

##### 8.6.2.1. Reagente de Kovacs

Álcool Isoamílico.....	150,0 ml
P-dimetilamino-benzaldeído .....	10,0 g
Ácido clorídrico.....	50,0 ml.

#### 8.6.3. Decarboxilação de aminoácidos: Lisina e Ornitina.

O caldo base empregado foi o Decarboxylase Medium Base ( Difco, 0872) o qual era adicionado do respectivo aminoácido: L-Lysine HCL ( Difco, 0705) ou L-Ornithine HCL ( Difco, 0293 ) na concentração de 1%. Após pesagem e dissolução do meio era feito o ajuste de pH, necessário sempre para a L-Ornitina com NaOH 10 N . O meio era distribuído em tubos ( 13x100) de tampa rosca e esterilizado a 121°C, 15

lb por 15 min. Após retirados do autoclave os tubos eram mantidos sob refrigeração até a utilização.

#### 8.6.4 Teste do Citrato

Foi utilizado o Simmons Citrate Agar ( Difco, 0091). O meio era preparado e aquecido até total dissolução. Era entubado, 2,5 ml aproximadamente, em tubos 13x100 tampados e autoclavados a 121°C, 15 lb por 15 min. Após esterilizados e com temperatura de aproximadamente 50°C eram inclinados para solidificação e estocados em refrigerador até o uso.

#### 8.6.5. Teste do Malonato

O meio utilizado foi o Malonate Broth ( Difco, 0395). O meio era preparado dissolvido em água destilada e entubado 3ml por tubo ( 13x100). Tampado com tampões de gaze e algodão e esterilizado por a 115°C, 15 lb, 10 min. Após esterilizados eram mantidos sob refrigeração até o uso.

#### 8.6.6. Teste de Fermentação de Carbohidratos - Dulcitol

O meio base Phenol Red Broth Base ( Difco, 0092 ) era preparado segundo as instruções do fabricante. Após a dissolução em água destilada eram adicionados para cada litro de meio base, 5 g de Dulcitol . Era distribuído em tubos (13x100) na quantidade de aproximadamente 2,5 ml, adicionados de um tubo de Durham invertido e autoclavados a 118°C 15 lb por 10 min. Os tubos eram armazenados sob refrigeração.