

545 535314

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

T
529.9
52142

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* sp. EM SUÍNOS AO
ABATE E EM CORTES DE PERNIL**

Dissertação de Mestrado

Roberta Macedo Bandeira

Porto Alegre, 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* sp. EM SUÍNOS AO
ABATE E EM CORTES DE PERNIL**

Roberta Macedo Bandeira
Bacharel em Ciências Biológicas (UFPel)

Dissertação apresentada com parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul
Março, 2003

ROBERTA MACEDO BANDEIRA
Bacharel em Ciências Biológicas - UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 11.04.2003
Pela Banca Examinadora

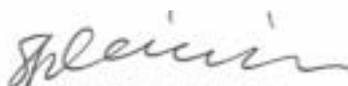
Homologado em: 21/05/2003
Por



MARISA RIBEIRO DE ITAPEMA CARDOSO
Orientadora-PPG-Microbiologia
Agrícola e do Ambiente



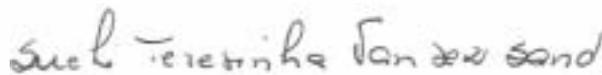
JOSE CARLOS GERMANI
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente



SÉRGIO OLIVEIRA
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA - ULBRA



CLÁUDIO WAGEK CANAL
DEP. DE MEDICINA ANIMAL - UFRGS



SUELI TERESINHA VAN DER SAND
DEP. MICROBIOLOGIA - UFRGS



GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Diretor da Faculdade
de Agronomia

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* sp. EM SUÍNOS AO ABATE E EM CORTES DE PERNIL¹

Autora: Roberta Macedo Bandeira

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Co-orientadora: Marisa da Costa

SINOPSE

A *Salmonella* sp. é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos, principalmente de origem animal. Os suínos podem ser portadores assintomáticos de *Salmonella* sp. e, nessa condição, serem levados ao abate. Desta forma, a entrada de *Salmonella* sp. na cadeia de produção é uma preocupação para a indústria. Sabendo-se da importância deste microrganismo, pelo seu impacto na indústria e na saúde pública, este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de *Salmonella* sp. em suínos levados ao abate em um frigorífico sob inspeção federal no Rio Grande do Sul, e correlacionar com a contaminação de cortes de pernil. Para tanto, 64 amostras de conteúdo intestinal e 121 amostras de cortes de pernil coletadas em 4 visitas, foram submetidas ao isolamento e identificação de *Salmonella* sp. As amostras de *Salmonella* sp. foram avaliadas quanto a resistência a 14 antimicrobianos, através da técnica de difusão em ágar. *Salmonella* sp. foi isolada de 46,87% das amostras de conteúdo intestinal e de 49,59% dos cortes de pernil. Foi encontrado grande número de sorovares, sendo os mais prevalentes Panama e Bredeney. Das amostras isoladas, 60,8% apresentaram perfil de multiresistência, sendo os maiores índices de resistência a sulfonamida, ácido nalidíxico e tetraciclina. Utilizando o perfil de resistência a antimicrobianos de amostras de um mesmo sorovar forma comparadas quanto a sua similaridade e agrupadas em dendrogramas, observou-se grande diversidade nas linhagens isoladas. Os resultados demonstraram que a entrada de animais no frigorífico excretando *Salmonella* sp., pode contribuir para a contaminação do produto final. A diversidade de sorovares e linhagens pode representar que são várias as fontes de contaminação, tanto dos animais quanto do produto final.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. (93p.) Março de 2003.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Salmonella* sp. IN PIGS AT SLAUGHTER AND IN PORK¹

Author: Roberta Macedo Bandeira
Adviser: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Co-Adviser: Marisa da Costa

Abstract

Salmonella sp. is one of the main causes of food borne disease, being the products of animal origin the most often implicated in outbreaks. Pigs are often asymptomatic carriers of *Salmonella* sp., and the slaughter of positive animals has been a great concern for the swine industry. Thus, the introduction of *Salmonella* sp. in the food chain is of importance for the swine industry and for the food safety as well. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *Salmonella* sp. in pigs at slaughter and to correlate with the contamination of pork processed in one slaughterhouse in Rio Grande do Sul. For this purpose, 64 samples of intestinal content and 121 samples of pork cuts, collected in 4 visits, were submitted to *Salmonella* isolation and identification protocol. Furthermore, the resistance profile of the isolated *Salmonella* strains were evaluated against 14 antimicrobials, using the agar diffusion test. *Salmonella* sp. was isolated from 46,87% of intestinal content samples and 49,59% of pork cuts. The isolated *Salmonella* strains belonged to nine different sorovars, being the sorovar Panama and Bredeney most prevalent. Most strains (60,8%) showed a multiresistance profile. Furthermore, resistance profiles against sulfonamides, nalidixic acid and tetracyclin were the most found. Using the resistance profile, strains belonging to the same sorovar were compared and dendrograms were constructed. In spite of belonging to the same sorovar and being isolated in the same visit to the slaughter plant, *Salmonella* strains showed a great diversity. These results demonstrated that the slaughter of pigs shedding *Salmonella* sp. in the feces, can result in the contamination of the final product in this slaughter plant. The diversity of sorovars and strains of *Salmonella* sp. indicated the multiple sources of contamination for animals and for the product.

¹Master of Science Dissertation in Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93p.) March, 2003.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Características gerais, classificação e nomenclatura da <i>Salmonella</i> sp. 3	
2.2. <i>Salmonella</i> sp. em suínos e a importância dos animais portadores.....	7
2.3. Fontes de contaminação na granja	8
2.4. Transporte e espera	12
2.5. Contaminação no abate	14
2.6. Salmonelose humana.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Local da coleta	22
3.2. Tamanho da amostra	22
3.3. Coleta de amostras de conteúdo intestinal	23
3.4. Coleta de amostras de produto final (cortes de pernil).....	24
3.5. Repetições da amostragem.....	25
3.6. Metodologia empregada no isolamento de <i>Salmonella</i> sp.	25
3.6.1. Pré-enriquecimento das amostras.....	25
3.6.2. Enriquecimento seletivo	26
3.6.3. Isolamento em meio sólido.....	26
3.6.4. Identificação dos isolados	26
3.7. Quantificação de <i>Salmonella</i> sp. no produto final (cortes de pernil).....	27
3.8. Confirmação sorológica.....	28
3.9. Sorotipificação de <i>Salmonella</i>	28
3.10. Armazenamento dos isolados	29
3.11. Perfil de resistência a antimicrobianos	29
3.12. Amostra controle	30
3.13. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Isolamento de <i>Salmonella</i> sp. em conteúdo intestinal e produto final (cortes de pernil)	32
4.2 Quantificação de <i>Salmonella</i> sp. em produto final (cortes de pernil).....	33
4.3. Sorovares de <i>Salmonella</i> encontrados em conteúdo intestinal e produto final (cortes de pernil)	33
4.4. Resistência dos isolados de <i>Salmonella</i> sp. a antimicrobianos.....	37
4.5. Perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados de <i>Salmonella</i> sp. 41	
4.6. Distância entre os isolados de <i>Salmonella</i> a partir dos perfis de resistência a antimicrobianos, demonstrados por sorovar e por coleta . 42	

5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	68
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9. APÊNDICES	79
9.1. Perfis de resistência a antimicrobianos apresentados pelos isolados de <i>Salmonella</i> sp. encontrados em amostras de conteúdo intestinal e produto final	80
9.2. Número de animais abatidos e número de animais positivos por coleta em cada localidade	82
9.3. Número de isolados, de cada sorovar, resistente a cada um dos 14 antimicrobianos testados	83
9.4. Número de isolados de cada sorovar com seus perfis de resistência... ..	84
9.5. Matriz de similaridade referente a Figura 10	86
9.6. Matriz de similaridade referente a Figura 11	87
9.7. Matriz de similaridade referente a Figura 12	88
9.8. Matriz de similaridade referente a Figura 13	89
9.9. Matriz de similaridade referente a Figura 14	90
9.10. Matriz de similaridade referente a Figura 15	91
9.11. Matriz de similaridade referente a Figura 16	92

RELAÇÃO DE TABELAS

1. Número e percentagens de sorovares de *Salmonella* sp. encontrados em conteúdo intestinal de suínos ao abate e produto final (cortes de pernil), coletados em um Frigorífico sob Inspeção Federal no Rio Grande do Sul..... 34
2. Número de isolados de cada sorovar de *Salmonella* sp. com perfil MR... 38
3. Número de isolados de amostras de produto final, demonstrados por sorovar, resistentes a cada antimicrobiano..... 40
4. Número de isolados de amostras de conteúdo intestinal, demonstrados por sorovar, resistentes a cada antimicrobiano 40

RELAÇÃO DE FIGURAS

1. Aspectos higiênicos e atitudes preventivas com respeito aos perigos de contaminação por bactérias durante o abate suíno	18
2. Prevalência de suínos ao abate positivos para <i>Salmonella</i> sp. no conteúdo intestinal e percentagem em cortes de pernil suíno, positivos para <i>Salmonella</i> sp. em Frigorífico sob Inspeção Federal, no Rio Grande do Sul.....	33
3. Número de isolados de cada sorovar na primeira coleta de produto final (Figura 3a) e conteúdo intestinal (Figura 3b).....	35
4. Sorovares isolados na segunda coleta de produto final (Figura 4a) e conteúdo intestinal (Figura 4b).....	35
5. Sorovares isolados na terceira coleta de amostras de produto final (Figura 5a) e conteúdo intestinal (Figura 5b).	36
6. Sorovares encontrados em amostras de produto final na quarta coleta (Figura 6a) e conteúdo intestinal (Figura 6b).....	35
7. Percentual de isolados com perfil MR em cada coleta.....	37
8. Contribuição dos isolados, com perfil MR e resistentes a menos de quatro antimicrobianos, de conteúdo intestinal e produto final, na composição do universo amostral.....	38
9. Número de isolados de <i>Salmonella</i> sp. resistentes a cada antimicrobiano.....	39
10. Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Typhimurium, encontrados no conteúdo intestinal e no produto final na primeira coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos.	43

11. Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Bredeney, encontrados no produto final na primeira coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos	44
12. Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Panama, encontrados no conteúdo intestinal e no produto final, na segunda coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos	45
13. Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Bredeney, encontrados no conteúdo intestinal e no produto final, na segunda coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos	46
14. Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Panama, encontrados no conteúdo intestinal e no produto final, na terceira coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos	47
15. Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Bredeney, encontrados no conteúdo intestinal e no produto final, na quarta coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos	48
16. Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Derby, encontrados no produto final, na quarta coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos	49

1.INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade em ascensão na pecuária brasileira. Esta ascensão está relacionada com a demanda do mercado, pois o consumo de produtos de origem suína, tanto de carne *in natura* como de produtos industrializados, vem crescendo.

É visando o mercado interno e, também, o mercado externo, que a indústria suinícola brasileira deve estar atenta ao problema que a *Salmonella* sp. pode representar, pois produtos de origem animal para exportação devem ter ausência deste microrganismo.

É um agente bacteriano freqüentemente envolvido em surtos de doenças transmitidas por alimentos, inclusive os de origem suína. A *Salmonella* sp. representa, portanto, uma barreira à comercialização de produtos de origem animal.

Os suínos são comumente portadores assintomáticos de *Salmonella* sp. e é exatamente na condição de portadores assintomáticos que representam o maior problema para a indústria. Uma vez que não desenvolvem a doença clínica, os animais portadores são levados ao abate e, com o estresse causado pelo transporte e pela espera, podem voltar a excretar a bactéria e, com isso, contaminar outros animais com a qual entrarão em contato.

Com a entrada de um animal contaminado na linha de abate, pode haver a disseminação do microrganismo e, por contaminação cruzada, ser transferido para as carcaças seguintes. Uma vez estando na linha de produção, a bactéria pode chegar até o produto final e, assim, chegar até o consumidor. A partir disso, haverá o risco do aparecimento de casos de toxinfecção alimentar devido à ingestão do próprio produto, ou de outro alimento que tenha sofrido contaminação cruzada durante o preparo da refeição.

Portanto, a *Salmonella* sp. merece atenção da cadeia de produção suinícola, pois, além de representar uma barreira comercial para exportação de seus produtos, o que pode acarretar prejuízos econômicos, também representa um problema de saúde pública, pelo risco que pode representar para o .consumidor. Levando-se em consideração estas informações, este trabalho teve por objetivo avaliar a prevalência de *Salmonella* sp. nos animais levados ao abate em um frigorífico sob inspeção federal, no Rio Grande do Sul, e correlacionar o nível de contaminação dos animais abatidos, com a presença do microrganismo em cortes de pernil suíno.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.Características gerais, classificação e nomenclatura da *Salmonella* sp.

As salmonelas recebem esta denominação devido ao bacteriologista americano Daniel E. Salmon, que identificou primeiramente essas bactérias (Pelczar et al., 1997).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, estando intimamente ligado aos gêneros *Escherichia* e *Shigella* (Pelczar et al., 1997). É representado por bacilos gram-negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos. Normalmente são móveis por meio de flagelos peritríquios, produtores de gás e ácido a partir da glicose, reduzem nitrato a nitrito e são produtores de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Utilizam citrato como única fonte de carbono, em geral são capazes de promover reação de descarboxilação de lisina e ornitina, são oxidase e indol negativos e não são capazes de hidrolisar a uréia (Holt et al., 1994).

Apesar do gênero apresentar características gerais em comum, existem alguns sorovares que apresentam variação, como a *Salmonella* Gallinarum e *S. Pullorum* que são imóveis, ou algumas amostras de *S. Choleraesuis* e de *S. Paratyphi A* que não produzem gás sulfídrico. O citrato

normalmente utilizado, não o é por *S. Typhi* e por *S. Paratyphi A*. Esta última também não descarboxila a lisina. A respeito da morfologia colonial, certas salmonelas formam colônias menores que as habituais (Holt et al., 1994).

A classificação e a nomenclatura das salmonelas sofreram várias modificações ao longo dos anos, não estando ainda bem definida. A classificação atual é baseada em características bioquímicas, dividindo o gênero em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo a primeira subdividida em seis subespécies. O método de identificação mais utilizado é o denominado esquema de Kauffmann & White, que divide as salmonelas em tipos sorológicos (sorovares), utilizando a composição antigênica destas bactérias com relação aos seus antígenos O (somáticos), H (flagelar) e Vi (capsular) (Trabulsi et al., 1999).

Cada sorovar é caracterizado por uma combinação particular de antígenos O e H. Os antígenos O são polissacarídeos termoestáveis localizados na parede celular bacteriana. Algumas salmonelas não possuem o antígeno O e, quando cultivadas em meio sólido, formam colônias irregulares (colônias rugosas). Estas salmonelas não podem, portanto, ser sorotipadas, sendo denominadas "não-tipáveis" (Franco et al., 2000). Os antígenos H apresentam-se sob duas formas, denominadas de fase 1 e fase 2 e, ao contrário dos antígenos O, são facilmente destruídos por tratamento térmico. Cada antígeno da fase 1 ocorre somente em poucos sorovares e é designado por uma letra, de a até z. Como o número de antígenos flagelares existentes é maior que o número de letras do alfabeto, a letra z é utilizada acompanhada de expoentes em números arábicos (z, z₂, z₃ etc.) (Trabulsi et al., 1999). Existem

poucos tipos de antígenos da fase 2, mas eles são amplamente distribuídos entre os sorovares de *Salmonella* e são, geralmente, designados por números (Pelczar et al., 1997). Existe apenas um tipo imunológico do antígeno Vi, sendo encontrado em apenas três sorovares: *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e *S. Dublin* (Franco et al., 2000).

Existem aproximadamente 2.400 sorovares de *Salmonella*, entre os quais cerca de 1.400 pertencem à subespécie enterica, que compreende cerca de 99,5% dos sorovares mais comumente isolados (Trabulsi et al., 1999). As salmonelas estão presentes em grande número de espécies de animais, sendo encontradas em praticamente todos os vertebrados (Fedorka-Cray, 1996). Nos suínos, podem estar localizadas tanto no trato digestivo, como nos tecidos linfáticos, mas o número de células varia entre os sítios de localização (Borch et al., 1996). A *Salmonella* tem grande capacidade de permanência no meio ambiente, podendo ser isolada de locais variados e diferentes e, conseqüentemente, de matérias primas alimentares (Jakabi et al., 1999).

Alguns tipos sorológicos são mais adaptados a determinada espécie de animal, mas outros, como a *Salmonella* Typhimurium, podem infectar, independentemente, o homem e animais, sendo este sorovar o maior responsável por infecções de origem alimentar (Trabulsi et al., 1999).

Em relação à especificidade da *Salmonella*, alguns sorovares apresentam-se bem adaptados a determinadas espécies, como o Abortusovis que é mais adaptado a ovinos (Trabulsi et al., 1999); os sorovares *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum, que tem maior afinidade pelas aves; a

Salmonella Choleraesuis e a *Salmonella* Dublin que tem preferência, respectivamente, por suínos e bovinos (Pinto, 2000).

Fatores envolvendo *Salmonella* em doenças alimentares são complexos e multifatoriais (Fedorka-Cray, 1996). O número de células necessário para desencadear a infecção clínica depende da virulência do sorovar envolvido (Pinto, 2000) e do estado imune do hospedeiro entre outros.

Uma das peculiaridades interessantes na epidemiologia da salmonela é o surgimento e subsequente desaparecimento de alguns sorovares em determinadas localidades. Entre vários casos relatados na literatura, destaca-se o caso do sorovar Hadar, detectado pela primeira vez em 1954, em Israel. Depois desse isolamento, esse sorovar passou a ser encontrado com freqüência na Inglaterra, tanto em material clínico humano quanto em alimentos, passado a ser isolado também no Canadá, na França e Estados Unidos. Após um período de ocorrência elevada (1975-1979), a freqüência de *Salmonella* Hadar na Inglaterra diminuiu bastante, porém permanece como quinto sorovar mais comum no Canadá (Franco et al., 2000).

Por outro lado, a *Salmonella* Typhimurium DT 104, primeiramente identificada em 1984 no Reino Unido, apresenta um número crescente de infecções em humanos, passando de 259 casos em 1990 para 4.006 em 1996. Isto sugere um padrão de crescimento contínuo da infecção por este sorovar (Cutter & Rivera-Betancourt, 2000).

2.2. *Salmonella* sp. em suínos e a importância dos animais portadores

A *Salmonella* Choleraesuis e *Salmonella* Typhimurium são os sorovares mais frequentemente associados a salmonelose suína. O primeiro é adaptado aos suínos e associado à doença clínica e o segundo, a infecções inaparentes/assintomáticas (Pinto, 2000).

A salmonelose em suínos pode comumente ocorrer como doença clínica ou infecção assintomática. Esta última é especialmente problemática, porque portadores, aparentemente sadios, tendem a eliminar o agente intermitentemente no ambiente e são, por esta razão, uma origem eminente de futuras infecções e de possíveis contaminações de instrumentos, podendo transferir o microrganismo para a carne e produtos suínos durante o abate (Anderson et al., 2001; Lettelier et al., 1999). Isto se deve às dificuldades em detectar os animais portadores antes do abate ou durante a inspeção das carcaças. Estes animais representam uma contínua fonte de contaminação no abatedouro e, conseqüentemente, do produto (Haddock, 1970).

É na condição de portadores hígidos que os suínos representam uma maior preocupação, pois neste estado se comportam como reservatórios de *Salmonella* e, conseqüentemente, disseminadores do microrganismo pelas fezes (Zebral et al., 1974). Gray et al. (1995) avaliaram suínos portadores de *Salmonella* Choleraesuis e sugeriram que estes são a principal fonte de novas infecções e disseminação da bactéria no ambiente.

Gray et al. (1995) observaram em seu estudo sobre rotas de inoculação de *Salmonella Choleraesuis*, que o período de tempo que os suínos, inoculados experimentalmente com *Choleraesuis*, permaneceram excretando o microrganismo variou de 2 semanas até longos períodos (superiores a 15 semanas). O período para a manutenção do estado de portador e possível disseminador da salmonelose foi correlacionado com a dose infectante (Gray et al., 1995).

As condições sanitárias das granjas são de crucial importância para evitar a instalação de uma infecção. Esta, uma vez instalada, difunde-se rapidamente pela via oro-fecal (Zebral et al., 1974). Apesar da via oro-fecal ser a mais comum forma de infecção, Gray et al. (1995) sugeriram que a exposição respiratória causa sintomas mais severos e influencia a manutenção da *Salmonella Choleraesuis* no suíno. Os animais expostos a rotas de inoculação intranasal permanecem excretando o microrganismo por um período de tempo superior àquele dos animais expostos pela rota gástrica (Gray et al., 1995).

2.3.Fontes de contaminação na granja

Higiene precária, uso de antibióticos de largo espectro e recontaminação das carcaças representam os maiores problemas na epidemiologia de *Salmonella* em granjas de suínos (Berends et al., 1997).

Os suínos podem ser infectados com *Salmonella* sp. por consumo de ração contaminada, contato com portadores no rebanho, ou pelo contato

com outras espécies de animais infectadas (Hume et al., 2001, Swanenburg et al., 2001)

Berends et al. (1996) concluíram que a falta de higiene, o uso de ração contaminada ou recontaminada, uso de antimicrobianos de amplo espectro, falhas na higiene e estresse durante o transporte são os mais importantes fatores de risco na prevalência de *Salmonella* na fase pré-abate.

Entre os fatores determinantes da qualidade das rações estão, além dos valores nutricionais, a contaminação por microrganismos patogênicos. No caso da transmissão de salmonela para suínos, a ração tem sido apontada como um fator de risco importante. Entre 379 amostras examinadas pelos laboratórios da EMBRAPA, 5,8% apresentavam-se contaminados por este microrganismo (Fialho et al., 1985). Michael (2000), ao acompanhar um surto num rebanho suíno no Rio Grande do Sul, isolou o microrganismo também na ração. Kich et al. (2001) examinaram a ração fornecida a suínos em 64 propriedades localizadas no RS e SC e encontraram 2 amostras positivas. Osterberg et al. (2001) isolaram *Salmonella* Yoruba da ração fornecida a um rebanho na Suécia, que durante o Programa Anual de Segurança apresentou presença de animais contaminados.

Estima-se que entre 15-30% das contaminações que ocorrem no período de terminação, podem ser atribuídas ao consumo de rações contaminadas (Berends et al., 1996).

Nos sistemas de produção, as rações são uma potencial forma de disseminação e manutenção da *Salmonella* nos animais (Lo Fo Wong et al., 2002; Beal et al., 2002). Em função das grandes quantidades de ração que são

produzidas, estocadas e transportadas diariamente para abastecer a indústria de produção de suínos, mesmo uma contaminação em baixos níveis pode ter um efeito potencial sobre vários rebanhos. Procedimentos de controle e descontaminação das rações, como tratamento térmico, são essenciais para evitar distribuição de ração contaminada para os rebanhos (Lo Fo Wong et al., 2002).

Davies et al. (1997), quando avaliaram a distribuição de *Salmonella* em rações moídas, encontraram 83,3% das amostras coletadas no misturador do engenho positivas. No entanto, Beal et al. (2002) observaram que a acidificação ou fermentação realizadas a 30°C podem reduzir a persistência de *Salmonella* em rações nas fazendas.

A presença de roedores portadores na propriedade também pode representar um risco, já que os suínos expostos a apenas um "pellet" de fezes de rato podem tornar-se infectados (Fedorka-Cray, 1996). Kich et al. (2001) ao determinar os fatores de risco associados a alta prevalência de animais soropositivos para *Salmonella* apontaram a presença de roedores na propriedade como um dos mais importantes.

O homem pode ser considerado o mais importante vetor, podendo distribuir um número maior de *Salmonella* que outros vetores. Botas, equipamentos e utensílios contaminados com fezes podem distribuir maior quantidade de *Salmonella* do que insetos e roedores podem excretar no ambiente (Berends et al., 1996).

Medidas de intervenção e controle de *Salmonella* num rebanho devem envolver um conjunto de atividades formuladas especificamente para o

rebanho em questão. Estas estratégias devem ser elaboradas de forma que sejam prática e economicamente viáveis para a granja (Lo Fo Wong et al., 2002).

Os princípios de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Boas Práticas de Manufatura (BPM) foram desenvolvidos para identificar os pontos críticos de controle onde os contaminantes podem ser excluídos, reduzidos ou minimizados (Borch et al., 1996, Fedorka-Cray, 1996). Para tornar estas práticas possíveis, a atenção tem sido focada para identificação de patógenos desde a granja, garantindo um produto seguro no momento que chega ao consumidor (Fedorka-Cray, 1996).

Boas práticas de manejo na granja são o principal meio de se controlar as doenças nos animais. No caso da *Salmonella* sp., esta pode chegar à granja por animais e pode ser difundida por alimentos ou água contaminada e práticas insatisfatórias no tratamento dos dejetos (APPCC, 1997).

Entretanto, van der Wolf et al. (2001a) observaram que as granjas que nunca haviam sido tratadas com desinfetantes após a limpeza dos ambientes, foram associadas a níveis mais baixos de contaminação por *Salmonella* que as tratadas com desinfetantes. Associou isto a limpeza inadequada, uma vez que funcionários mal treinados podem acreditar que o desinfetante é ativo mesmo com presença de matéria orgânica na superfície a ser limpa.

A melhor forma de prevenção e controle de *Salmonella* na granja é melhorar a higiene e reduzir a exposição dos animais a fatores de risco. Além

disso, há granjas que possuem seu próprio ciclo de contaminação cruzada com certos sorovares de *Salmonella*. Neste caso, é necessário um programa de controle executado simultaneamente, na maternidade, creche, recria e terminação (Berends et al., 1996).

2.4. Transporte e espera

A disseminação da *Salmonella* entre os animais é especialmente propiciada por condições estressantes provocadas pelo transporte, privação de alimento e água, temperaturas instáveis, confinamento com superlotação antes do abate, quando o período de repouso no abatedouro é prolongado (Pinto, 2000). A transmissão e colonização da *Salmonella* nos animais se dá, primordialmente, durante o transporte e o período de espera para o abate.

Até 20% dos suínos livres de *Salmonella* são contaminados durante o transporte e espera. Este grupo consistirá de animais com infecção atual, com infecções latentes reativadas e animais que já vieram excretando *Salmonella* da granja (Berends et al., 1996).

A fase de transporte pode influenciar a amplitude do problema envolvendo a contaminação de animais e, posteriormente, da carcaça, mas o problema da infecção por *Salmonella*, de fato, inicia na granja. Portanto, o transporte e espera otimizados podem somente minimizar o número de animais infectados (Berends et al., 1996).

Para evitar contaminação cruzada no transporte, espera e abate, animais livres de *Salmonella* devem ser separados daqueles positivos, ou daqueles com estado desconhecido (Berends et al., 1996).

A limpeza e desinfecção completa dos caminhões, entre cada carga de animais, poderia assegurar a ausência de *Salmonella* antes da condução do próximo rebanho (Swanenburg, 2000). No entanto, Swanenburg (2000) quando avaliou os efeitos da logística pré-abate na prevalência de *Salmonella* nos suínos, observou que a limpeza e desinfecção dos caminhões não é suficiente para eliminar a bactéria dos veículos.

O tempo de espera para o abate poderia ser minimizado, pelo menos para os animais *Salmonella*-negativos (Swanenburg et al., 2001). A separação dos animais por lote na espera poderia ser utilizada (Swanenburg, 2000), evitando assim a mistura de animais de rebanhos diferentes (Lo Fo Wong et al., 2002).

Condições insatisfatórias associadas a longos períodos de permanência nos currais podem aumentar a difusão de organismos entéricos e estressar o animal, aumentando a excreção de *Salmonella* pelos animais portadores, afetando também a qualidade da carne, mediante o desenvolvimento de condições que encurtam a vida de estocagem da mesma (APPCC, 1997).

Portanto, após a chegada ao frigorífico, existem várias etapas importantes em que pode ocorrer contaminação e que devem ser monitoradas e controladas (Figura 1).

2.5. Contaminação no abate

Os suínos podem ser contaminados indiretamente por fatores externos, como o ambiente contaminado, as superfícies, os equipamentos ou as pessoas no frigorífico, antes e/ou depois do abate (Swanenburg, 2000).

Durante o abate, as técnicas geralmente empregadas podem favorecer o ingresso de microrganismos nos tecidos. Entretanto, com práticas de cuidados higiênicos razoáveis (ex. descontaminação das facas de abate entre um animal e outro), os riscos podem ser diminuídos (APPCC, 1997).

A escaldagem representa um ponto crítico, porque envolve a contaminação microbiana sobre a pele. Durante a escaldagem de suínos, os microrganismos da pele e do conteúdo retal podem penetrar na carcaça, chegando aos tecidos mais internos. Medidas higiênicas devem ser implementadas para prevenir a difusão da contaminação através de mãos, facas, serras e equipamentos. Ao escaldar os suínos, a temperatura da água deve ser mantida acima de 60°C a um fluxo suficiente para impedir o acúmulo excessivo da contaminação. A presença de pelos, matéria fecal ou sujeira sobre as carcaças ou a carne são indícios de higiene insatisfatória (APPCC, 1997).

Durante a depilação, pode haver um aumento na chance de contaminação e/ou recontaminação das carcaças por organismos entéricos, pois, durante o processo, pode haver propagação de matéria fecal sobre a superfície das carcaças (Borch et al., 1996). Uma das formas de minimizar esse problema, é aumentando a temperatura da água que circula na máquina,

o que pode controlar a população de microrganismos sensíveis à temperatura (Gill & Bryant, 1993). A toailete de depilação, apesar de representar um papel menos importante na contaminação de carcaças com *Salmonella* do que a evisceração, contribui com 5 a 15% das contaminações que podem ocorrer (Berends et al., 1997).

O número de microrganismos pode ser diminuído também pela flambagem das carcaças (Gill & Bryant, 1993). No entanto, a eliminação dos mesmos ocorrerá somente na superfície da carcaça (Borch et al., 1996). A escaldagem e a flambagem não são capazes de controlar a contaminação que existia antes do abate (Berends et al., 1997).

As atuais práticas de evisceração contribuem em 55-90% de todas as carcaças contaminadas, já os equipamentos de polimento contribuem com 5-15% deste total. Serragem e inspeção da carne juntos, ou seja, estes dois momentos somados, podem contribuir entre 5-30% na contaminação das carcaças (Berends et al., 1997).

Na evisceração, a retirada das vísceras intactas representa pouco perigo, mas o vazamento do conteúdo intestinal pode causar a contaminação cruzada. Para minimizar estes riscos, é necessário o treinamento e a supervisão dos manipuladores para garantir a evisceração sem contaminação de carcaça (APPCC, 1997).

Ao avaliar o ambiente em abatedouro no Rio de Janeiro, Lázaro et al. (1997) encontraram na mesa de evisceração a maior origem de contaminação já que 45,5% das amostras foram positivas para *Salmonella*.

A contaminação por *Salmonella* pode ocorrer via faríngea, conteúdo estomacal ou fezes (Borch et al., 1996). Os maiores pontos de contaminação durante o abate suíno são a contaminação fecal, faríngea e ambiental (Borch et al., 1996).

O problema da contaminação, direta ou cruzada, de carcaças ocorre porque animais positivos para *Salmonella* estão sendo abatidos. A melhor e mais eficiente solução seria realizar o abate dos animais livres de *Salmonella* separadamente (Berends et al., 1997).

Borch et al. (1996) estabeleceram que o processo de abate de suínos pode apresentar etapas onde os riscos de contaminação podem ser minimizados, mas nenhum ponto onde seja eliminado por completo.

Apenas um ponto na linha de produção tornando-se contaminado com *Salmonella*, determinará a disseminação para as carcaças seguintes (Berends et al., 1998a), podendo a bactéria ser isolada dos equipamentos e das mãos dos trabalhadores (Berends et al., 1997).

Ao final do processamento da carcaça, a contaminação poderá ter uma ou mais das seguintes origens: do próprio animal, do animal abatido anteriormente ou por equipamentos persistentemente contaminados. Os níveis de contaminação da carcaça ao final do processamento dependerão do impacto combinado destes fatores (Lo Fo Wong et al., 2002).

Finalmente, ao longo da cadeia de produção alimentar a contaminação cruzada pode ocorrer em, alguns casos, no momento da comercialização. No açougue, ocorrem muitas oportunidades para contaminação cruzada com *Salmonella*. Cortes para consumo primário e/ou

carcaças muitas vezes manipuladas, pela mesma pessoa, com os mesmos utensílios, as mesmas máquinas e na mesma bancada de corte, sem nenhuma limpeza ou desinfecção. Carnes cruas de diferentes espécies animais, incluindo aves e produtos cárneos cozidos, são muitas vezes colocados no mesmo balcão ou em locais adjacentes (Berends et al., 1998b).

Passo do processo	Aspectos higiênicos	Atitudes preventivas
Descanso	Contaminação entre animais	Limpeza e desinfecção Separar animais positivos de negativos/desconhecidos Separar os lotes
↓		
Insensibilização		
↓		
Sangria	Contaminação de utensílios	Limpeza e desinfecção
↓		
Escaldagem	Redução dos níveis de bactérias	Tempo/temperatura
↓		
Depilação	Contaminação de máquinas	Limpeza e desinfecção
↓		
Chamuscamento	Redução dos níveis de bactérias	Tempo/temperatura
↓		
Toailete	Contaminação de máquinas	Limpeza e desinfecção
↓		
Evisceração	Contaminação pelos intestinos Contaminação da língua, faringe e tonsilas Contaminação dos utensílios	Separação do reto Treinamento dos trabalhadores Desinfecção dos utensílios
↓		
Desnucação	Contaminação via separador/serra	Velocidade do processo Temperatura da água
↓		
Linha de Inspeção	Contaminação pela inspeção	Desinfecção dos utensílios
Serragem da	Contaminação pela cabeça	Treinamento dos trabalhadores Desinfecção dos utensílios

FIGURA 1: Aspectos higiênicos e atitudes preventivas com respeito aos perigos de contaminação por bactérias durante o abate suíno.

Fonte: Borch et al., 1996

2.6. Salmonelose humana

A salmonelose humana é um problema mundial. Oficialmente, são registrados, anualmente, entre 40.000 a 60.000 casos da doença nos EUA, mas estimativas do número de casos reais chegam a alcançar 3 milhões. O Centro de Prevenção e Controle de Doenças estima que 95% dos casos de salmoneloses em humanos são transmitidos por alimentos, e a *Salmonella* tem sido encontrada em vários alimentos, água e ambiente (Wells et al., 2001). Sojka & Gitter (1961) apresentam evidências seguras de que a intoxicação alimentar humana por salmonelas pode originar-se de produtos suínos, especialmente a *Salmonella* Typhimurium. Este tipo de relação foi confirmada por Maguire et al. (1993) num surto de infecção humana por *Salmonella* Typhimurium que afetou 206 indivíduos na Dinamarca, em que a fonte de infecção foi precisamente traçada à ingestão de carne suína contaminada.

No Brasil, não existem dados oficiais, porém, no período de 1994 a 1996, no Estado do Rio Grande do Sul (RS), registrou-se 657 surtos, na Secretaria da Saúde e Meio Ambiente-RS, envolvendo 40.120 pessoas. Destas, em média, 10% necessitaram de hospitalização, sendo a *Salmonella* o segundo agente bacteriano mais encontrado (Flores et al., 2001).

Um surto de toxinfecção alimentar ocorreu em Araraquara no ano de 1983, envolvendo 561 operários. Estes foram contaminados no refeitório de uma empresa e, na mesma tarde, apresentaram um quadro de gastroenterite por *Salmonella* (Landgraf et al., 1985). Entre 1994 e 1997, foram identificadas

23 amostras positivas para *Salmonella* em alimentos na Grande São Paulo, destas 18 estavam relacionadas com surtos. Os casos fatais informados neste estudo foram pela ingestão de produto cárneo contaminada com *Salmonella* Enteritidis (Jakabi et al., 1999). Em outro estudo, foram isolados 17 sorovares diferentes de salmonela em 140 isolamentos feitos entre janeiro de 1992 e dezembro de 1996, em São Paulo. Os alimentos estudados foram relacionados a 12 surtos que ocorreram neste período (Lírio et al., 1998).

Nos EUA, em geral, os surtos de salmonelose ocorrem em ambiente doméstico, pela ingestão de alimento ou água contaminada. A transmissão direta fecal-oral ocorre particularmente em crianças, pois, apenas um morador na casa sendo acometido pode disseminar salmonelose para até 1/3 dos outros moradores (Rubino, 1997)

Rubino (1997) estimou que são gastos bilhões de dólares a cada ano nos EUA, para tratamento de salmonelose humana causada simplesmente por má manipulação dos alimentos em cozinhas comerciais e domésticas.

Os fatores de risco associados a doenças de origem alimentar são numerosos. Entre eles estão cocção, manipulação e/ou estocagem inadequadas do alimento e, contaminação cruzada antes, durante e depois do preparo de alimento (Rubino, 1997).

O impacto econômico resultante da salmonelose é percebido nas perdas dos produtos cujos animais tiveram perda da eficiência alimentar, redução do ganho de peso ou mortes causadas pela salmonelose crônica. Custos com programas vigilância alimentar e custos para a indústria na retirada de produtos e recolocação no mercado (Rubino, 1997).

A redução da contaminação com *Salmonella* é cara e pode envolver mudanças nas práticas de criação animal, redução da contaminação cruzada ao longo da linha de produção, redução do tempo de estocagem dos alimentos, ensino de técnicas de sanitização e de manipulação apropriadas para preparo de alimentos, ou a implementação de novas técnicas, como a irradiação de alimentos embalados. Ainda não se conhece qual a melhor combinação de estratégias para ter um melhor efeito na redução de salmonelose de origem alimentar (Rubino, 1997).

Uma outra preocupação que existe em relação aos agentes bacterianos que podem ser possíveis causadores de doenças de origem alimentar, é o aumento na resistência a antimicrobianos, que parece ser uma tendência entre estes patógenos.

Entre os agentes bacterianos que possuem como reservatório primário o homem, a emergente resistência está relacionada ao uso de antimicrobianos pela população humana. Já nos patógenos que tem alimentos de origem animal como reservatório primário, o principal desencadeador da resistência é o uso de antimicrobianos na pecuária. O uso desse, no tratamento de doenças, na promoção de crescimento contribui para a seleção de linhagens resistentes e a sua subsequente multiplicação (Tauxe, 2002).

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1.Local da coleta

As amostras de conteúdo intestinal, coletadas dos animais no momento do abate, e de produto final, cortes de pemil provenientes dos animais que haviam sido coletados no dia anterior, foram coletadas no período entre julho de 2001 e março de 2002 em um frigorífico sob Inspeção Federal situado no Rio Grande do Sul. Os animais foram provenientes, mesmo quando coletados no mesmo dia de abate de localidades diferentes. A distribuição dos animais está apresentada no Apêndice 2.

3.2.Tamanho das amostras

O número de amostras de conteúdo intestinal foi calculado com base em uma prevalência previamente determinada por Bessa (2001), em estudo realizado no laboratório. Portanto, considerou-se a prevalência esperada de 50%, um intervalo de confiança de 95% e uma precisão absoluta de 25%, resultando num total de 16 amostras (n=16), segundo a Tabela III.4 Toma et al.

(1999a). A partir desta amostragem foi determinada a prevalência de suínos positivos para *Salmonella* sp. em um dia de abate.

Para as três primeiras coletas de cortes de pernil (produto final), o número de amostras foi calculado levando em consideração uma prevalência detectável de 3%, pois se esperava uma baixa prevalência de produto final contaminado, e um nível de confiança de 95% resultando num total de 99 amostras (n=99), segundo a Tabela III.8 Toma et al. (1999b). As amostras foram processadas em 'pool' de três, desta forma se esperou sensibilidade na detecção de *Salmonella* sp., resultando em 33 amostras. Para calcular o tamanho da amostra, na quarta coleta, foi estabelecida uma prevalência detectável de 10% e um nível de confiança de 95%, resultando em 22 amostras (n=22), segundo a Tabela III.9 Toma et al. (1999c). As 22 amostras foram processadas individualmente para posteriormente serem escolhidas aleatoriamente, entre as positivas, duas amostras para serem submetidas a protocolo de quantificação. A partir destas amostragens, foi determinado se existia a presença de *Salmonella* sp. em cortes de pernil.

3.3.Coleta de amostras de conteúdo intestinal

Foram colhidas, de cada carcaça, um fragmento do intestino para coleta do conteúdo no laboratório. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração (em isopor forrado com gelo reciclável) e embaladas individualmente em sacos plásticos identificados até a chegada ao laboratório. As amostras foram processadas em um intervalo de tempo menor que 16 horas

(tempo entre o término da coleta no frigorífico e o início do processamento do material, sempre na manhã do dia seguinte). Foram coletadas e analisadas no total 64 amostras de conteúdo intestinal de suínos ao abate.

3.4.Coleta de amostras de produto final (cortes de pernil)

Entre as amostras de pernil que foram analisadas na quarta coleta, que apresentaram presença de *Salmonella* sp, foram escolhidas aleatoriamente 2 amostras, para a quantificação do microrganismo. Assim, estabeleceu-se o número mais provável de *Salmonella* sp. no produto final.

As amostras foram coletadas no mesmo frigorífico que aquelas de conteúdo intestinal, no dia subsequente ao abate, de forma que os cortes fossem provenientes dos animais coletados na véspera. As amostras foram coletadas em porções de aproximadamente 50 gramas e embaladas individualmente em sacos plásticos identificados. Estes materiais foram mantidos sob refrigeração em isopor forrado com gelo reciclável por, no máximo, 16 horas (tempo entre o término da coleta no frigorífico e o início do processamento do material, sempre na manhã do dia seguinte).

As amostras da quarta coleta, após serem processadas, voltaram a refrigeração sob uma temperatura de 4°C até a confirmação da presença de *Salmonella* sp. A partir deste resultado, foram escolhidas duas, entre aquelas com a presença da bactéria, que foram submetidas ao protocolo de quantificação. Foram analisadas no total 121 amostras de produto final (cortes de pernil) (n=121).

3.5.Repetições da amostragem

Foram realizadas quatro visitas para coleta de conteúdo intestinal e quatro visitas para coleta de produto final (cortes de pernil), em lotes e dias distintos. Os experimentos para prevalência de *Salmonella* sp. nos animais e presença de *Salmonella* sp. no produto final (cortes de pernil) foram realizados em cada uma das coletas. No entanto, o ensaio para quantificação da bactéria no produto final (cortes de pernil), foi realizado somente uma vez, na quarta coleta.

3.6.Metodologia empregada no isolamento de *Salmonella* sp.

A metodologia seguida foi estabelecida por Michael (2000), que compreende as seguintes etapas:

3.6.1.Pré-enriquecimento das amostras

Alíquotas de 25 gramas de material (conteúdo intestinal ou pernil) foram homogeneizadas, individualmente, em macerador de tecidos (Stomacher Bag Mixer Interscience 78860) com 225mL de água peptonada tamponada 1% estéril por 60 segundos e incubadas em estufa a 37°C/18-24 horas, sob condições normais de aeração. Para as amostras de produto final (cortes de pernil) que foram processadas em 'pool' de três, foram pesadas 25 gramas

com porções proporcionais de cada uma das amostras que compunham o 'pool'.

3.6.2. Enriquecimento seletivo

Alíquotas de 100 µL e de 1mL, provenientes do pré-enriquecimento, foram transferidos para Caldo Rappaport-Vassiliadis e Caldo Tetrionato Müller-Kauffmann, respectivamente, e incubados em banho d'água (banho Maria) (Thermomix MM 20U) a 42°C/24 horas, sob condições de aeração normais.

3.6.3. Isolamento em meio sólido

Uma alçada de cada um dos caldos de enriquecimento foi semeada nos meios seletivos Ágar Verde Brilhante-Lactose-Sacarose (BPLS) suplementado com 0,1% de novobiocina a 4% e Ágar Xilose-Lisina-Tergitol 4 (XLT4). As placas foram incubadas em estufa a 37°C/24-48 horas, sob condições normais de aeração.

3.6.4. Identificação dos isolados

As colônias típicas e suspeitas de *Salmonella* sp foram identificadas pelas características morfológicas e bioquímicas. Para as provas bioquímicas foram utilizados os meios Triple Sugar Iron (TSI), Lysine Iron Agar (LIA), Ágar

Citrato de Simmons, Ágar Fenilalanina, Caldo ONPG, Meio SIM e Caldo Uréia. Os meios foram semeados e incubados em estufa por 18-24horas/37°C, sob condições normais de aeração.

3.7.Quantificação de *Salmonella* sp. no produto final (cortes de pernil)

Para quantificação de *Salmonella* sp. presente em amostras de pernil de suíno, foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP) modificada (Dufrenne et al., 2001), que compreende as seguintes etapas: foram pesados assepticamente 25 gramas da amostra e homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada 1% estéril, em macerador de tecidos (Stomacher Bag Mixer Interscience 78860) por 60 segundos. O homogeneizado foi fracionado em 3 alíquotas de 50mL, que foram transferidas para frascos estéreis, 3 alíquotas de 5mL, também acondicionadas em tubos de ensaio estéreis e 3 alíquotas de 0,5mL, que foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5mL de água peptonada tamponada 1% estéril. Os frascos e os tubos de ensaio foram incubados em estufa por 18-24horas/37°C, sob condições normais de aeração. Após o período de incubação, os inóculos foram submetidos aos procedimentos de isolamento e identificação de *Salmonella* sp., como descrito anteriormente. O número mais provável de *Salmonella* sp. presente no produto final foi calculado pela contagem das colônias, das placas dos meios sólidos, confirmadas como sendo *Salmonella*

sp. e, pela tabela de de Man (1983), chegou-se ao número mais provável de *Salmonella* sp. nas amostras.

3.8.Confirmação sorológica

A confirmação definitiva dos isolados identificados pelas provas bioquímicas como sendo *Salmonella* sp. foi feita pela aglutinação em lâmina, utilizando Soro *Salmonella* Polivalente Somático (PROBAC). O teste foi realizado a partir de culturas de 18 horas/37°C, sob condições normais de aeração, crescidas em Ágar Triptona de Soja (TSA). Tocou-se com a alça de inoculação em uma colônia e, sobre uma lâmina de microscopia, homogeneizou-se-a em uma alçada de solução tampão fosfato salina (PBS). Foi adicionada, a esta solução inicial, uma gota de soro que foi homogeneizada com movimentos rotatórios delicados para observação da aglutinação.

3.9.Sorotipificação de *Salmonella*

Após a identificação e confirmação bioquímica e sorológica dos isolados, eles foram reisolados em placas contendo TSA e incubados por 18 horas/37°C, sob condições normais de aeração. Em seguida tocou-se uma colônia, de cada placa, com agulha de inoculação e semeou-se em profundidade em microtubos contendo 1mL do mesmo meio de cultura, estes microtubos foram identificados e incubados por 18 horas sob as mesmas condições de temperatura e de aeração. Os microtubos contendo os isolados

foram embalados e enviados para o setor de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do Instituto Osvaldo Cruz, no Rio de Janeiro, para sorotipificação.

3.10. Armazenamento dos isolados

Os isolados foram semeados em tubos contendo 5mL de Caldo Brain Heart Infusion (BHI), a partir de placas de meio TSA. Os tubos contendo caldo BHI, após inoculados, foram incubados a 37°C por 18 horas em estufa. Após o período de incubação, foram retirados 800µL de cada um dos tubos e transferidos para microtubos contendo 200µL de glicerol estéril. Estes isolados foram identificados e congelados em freezer (Prosdócimo F-21) a -20°C.

3.11. Perfil de resistência a antimicrobianos

Foi utilizado o método de Difusão de Bauer & Kirby, segundo Hindler (1998).

Os isolados foram recuperados em caldo BHI e reisolados em placas contendo TSA. Em ambos os procedimentos as culturas foram incubadas em estufa por 18 horas/37°C, em condições normais de aeração. Tocou-se, com uma alça de inoculação, o topo de uma das colônias e transferiu-se para um tubo contendo Caldo BHI. O inóculo foi incubado em estufa a 37°C sob agitação até atingir uma turbidez equivalente aquela do tubo 0,5 da Escala de

McFarland (suspensão de BaSO₄), equivalente a 10⁸ UFC/mL (unidades formadoras de colônia/mL).

Foram utilizados discos impregnados dos seguintes antimicrobianos (Sensifar): amicacina 30µcg (AMI), estreptomicina 10µcg (EST), ácido nalidíxico 30µcg (NAL), sulfonamida 300µcg (SUL), cefaclor 30µcg (CFC), neomicina 30µcg (NEO), gentamicina 10µcg (GEN), tobramicina 10µcg (TOB), cloranfenicol 10µcg (CLO), ciprofloxacina 50µcg (CIP), ácido clavulônico+amoxicilina 30µcg (AMC), cotrimoxazol 25µcg (SUT), tetraciclina 30µcg (TET) e ampicilina 10µcg (AMP).

Foi utilizado ágar Mueller-Hinton (MH) distribuído em placas em uma profundidade de aproximadamente 4mm. Com um suabe, os inóculos foram semeados nas placas com ágar MH, de forma que o inóculo ficasse totalmente distribuído na superfície do ágar. Aguardou-se o ágar absorver o inóculo e colocou-se os discos sobre a superfície inoculada. As placas foram incubadas em estufa a 37°C/24horas, sob condições normais de aeração. Após o período de incubação, os halos das zonas de inibição foram medidos e consultada a tabela do NACCLS para interpretação dos resultados.

3.12.Amostra controle

Todos experimentos foram acompanhados de um controle positivo constituído de uma amostra de *Salmonella* Typhimurium isolada em estudos anteriores no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.13. Análise estatística

Os dados de prevalência de *Salmonella* sp. nos animais ao abate e presença de *Salmonella* sp. no produto final foram comparados pelo teste de Wilcoxon, utilizando-se o programa SPSS.

As amostras tiveram seus perfis de resistência a antimicrobianos analisadas para construção dos dendrogramas pelo método de agrupamento UPGMA, usando a distância Euclidiana, através do Pacote Estatístico SAS.

As análises foram realizadas no Núcleo de Assessoria Estatística desta Universidade (NAE/UFRGS).

4.RESULTADOS

4.1.Isolamentos de *Salmonella* sp. em conteúdo intestinal e produto final (cortes de pernil)

Nas quatro coletas realizadas encontrou-se uma prevalência média de suínos positivos para *Salmonella* no conteúdo intestinal, ao abate, de 46,87% (30/64), com valores variando entre 31,25% (5/16 - coleta 1) e 68,75% (11/16 - coleta 3) (Figura 2). Os cortes de pernil provenientes destes lotes de animais, por sua vez, foram positivas para *Salmonella* sp. em 49,59% (62/121) das amostras, com valores variando entre 35,97% (7/22 - coleta 4) e 62,82% (22/33 - coleta 2) (Figura 2).

Em todas as coletas, não houve diferença significativa entre as percentagens de amostras positivas encontradas no conteúdo intestinal com aquelas presentes no produto final.

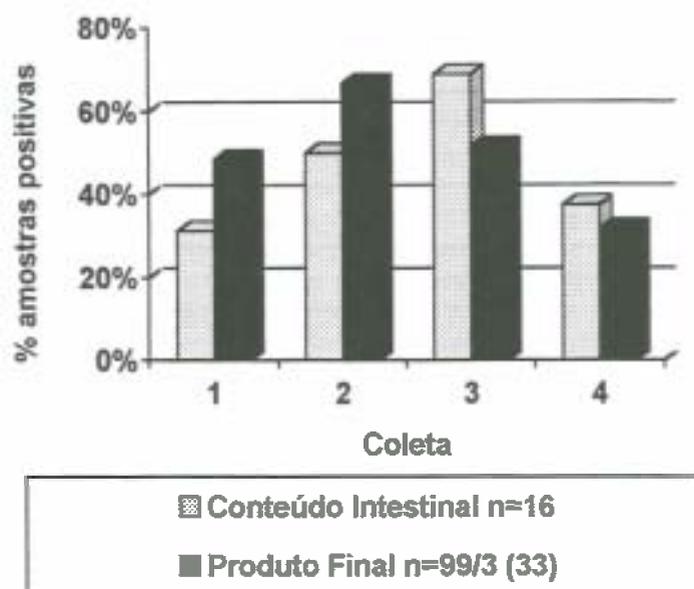


FIGURA 2: Prevalência de suínos ao abate positivos para *Salmonella* sp., no conteúdo intestinal e percentagem em cortes de pernil suíno, positivos para *Salmonella* sp. em Frigorífico sob Inspeção Federal, no Rio Grande do Sul.

4.2. Quantificação de *Salmonella* sp. em produto final (cortes de pernil)

Na quarta coleta, em duas amostras positivas entre os 22 cortes de pernil processados individualmente e submetidos a protocolo de quantificação de *Salmonella* sp. encontrou-se >110 NMP/g e 1,1 NMP/g.

4.3. Sorovares de *Salmonella* encontrados em conteúdo intestinal e produto final (cortes de pernil)

Foram encontrados 10 sorovares diferentes de *Salmonella* sp. e 9 amostras de *Salmonella* sp. não tipáveis (Tabela 1). Destes 10 sorovares, 9 foram encontrados no conteúdo intestinal e 8 foram encontrados no produto final. Na Tabela 1 é possível observar que o sorovar Ohio foi somente isolado a

partir de Produto final, enquanto, os sorovares Agona e Orion foram somente isoladas a partir de conteúdo intestinal.

O sorovar mais encontrado, em todo o experimento, quando examinou-se os dois materiais (conteúdo intestinal e produto final), foi o Panama, seguido pelo sorovar Bredeney.

TABELA 1: Número e percentagem de sorovares de *Salmonella* sp. encontrados em conteúdo intestinal de suínos ao abate e produto final (cortes de pernil) coletados em um Frigorífico sob Inspeção Federal no Rio Grande do Sul.

Sorovar	Conteúdo Intestinal n=30	Produto Final N=62
Panama	9 (30%)	24 (38,7%)
Bredeney	5 (16,7%)	13 (20,9%)
Typhimurium	5 (16,7%)	4 (6,4%)
Minnesota	3 (10%)	4 (6,4%)
Derby	2 (6,7%)	4 (6,4%)
Mbandaka	2 (6,7%)	3 (4,8%)
Orion	2 (6,7%)	0
Ohio	0	3 (4,8%)
Agona	1 (3,3%)	0
<i>Salmonella</i> sp.	1 (3,3%)	8 (12,9%)

Avaliando-se a diversidade dos sorovares de *Salmonella* sp. encontrados, observou-se que, na primeira coleta, o sorovar Typhimurium foi o predominante, enquanto que no produto final foi o Bredeney (Figura 3).

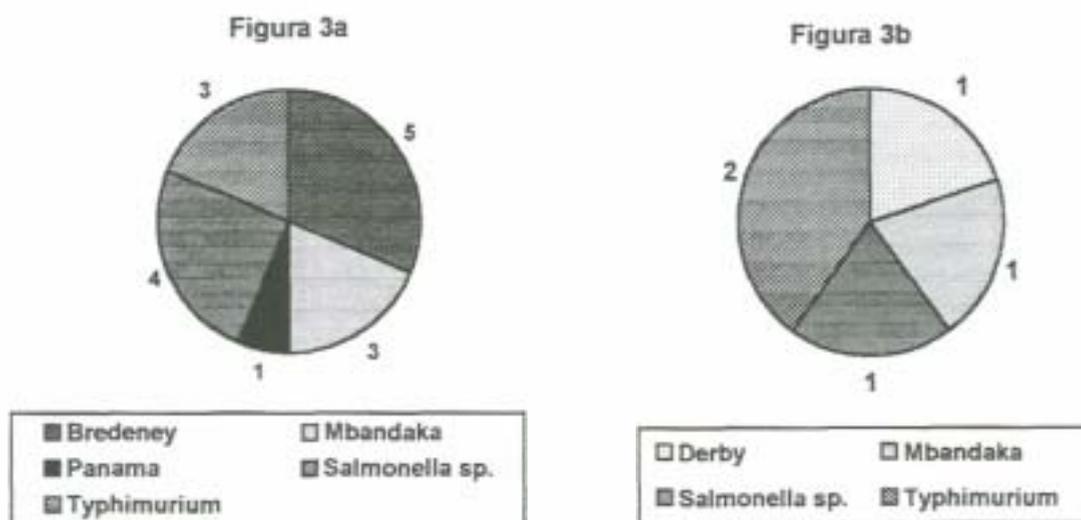


FIGURA 3: Número de isolados de cada sorovar na primeira coleta de produto final $n=16$ (Figura 3a) e conteúdo intestinal $n=5$ (Figura 3b).

Na segunda e terceira coletas, foi encontrada predominância do sorovar Panama em ambos os materiais (Figura 4 e 5, respectivamente).

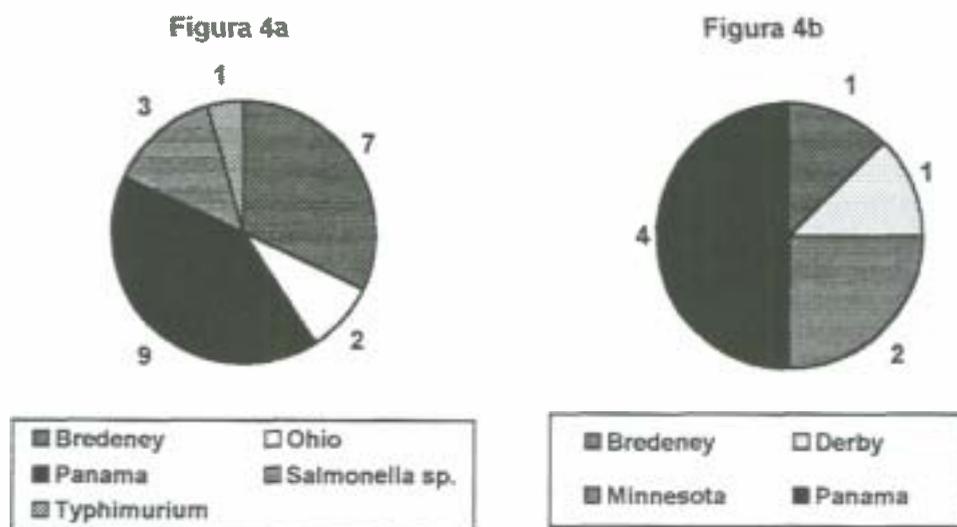


FIGURA 4: Sorovares isolados na segunda coleta de produto final $n=22$ (Figura 4a) e conteúdo intestinal $n=8$ (Figura 4b).

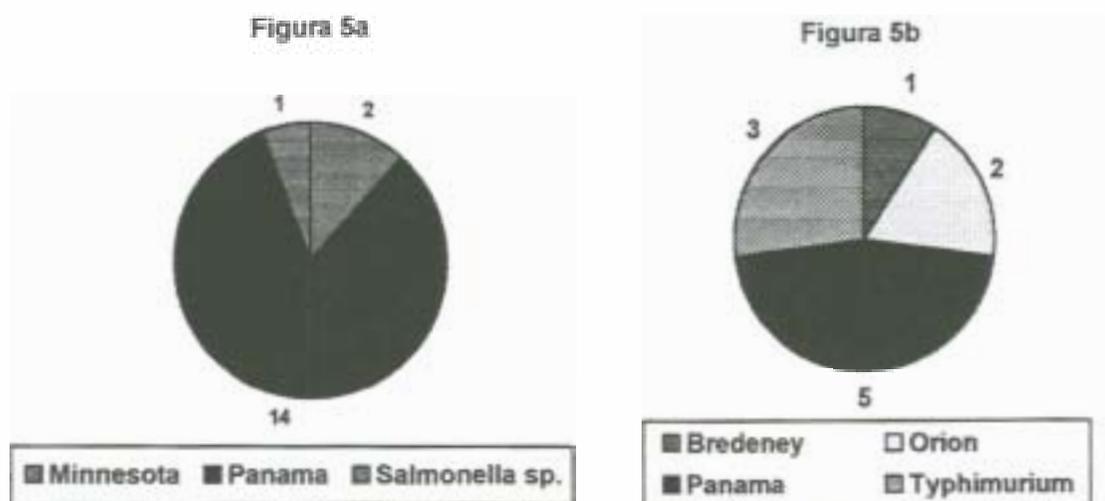


FIGURA 5: Sorovares isolados na terceira coleta de amostras de produto final n=17 (Figura 5a) e conteúdo intestinal n=11 (Figura 5b).

Na quarta coleta, os sorovares mais encontrados foram Bredeney e Derby no conteúdo intestinal e produto final, respectivamente (Figura 6).

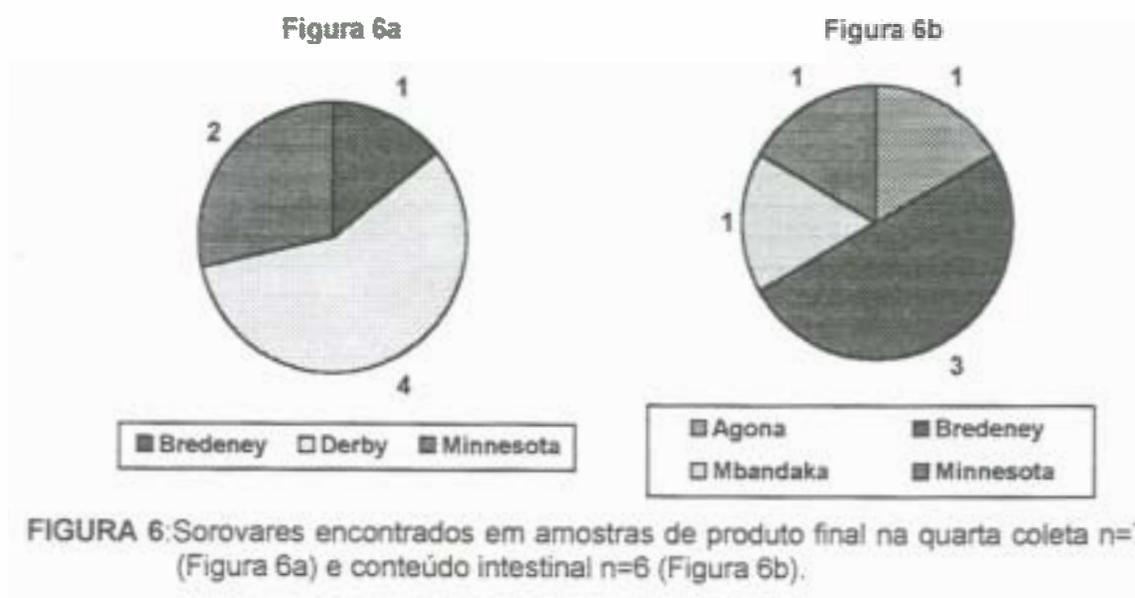


FIGURA 6: Sorovares encontrados em amostras de produto final na quarta coleta n=7 (Figura 6a) e conteúdo intestinal n=6 (Figura 6b).

Alguns sorovares, como Bredeney e Panama, estiveram presentes na maior parte das coletas, em pelo menos um dos materiais coletados. Já sorovares como, Ohio, Orion e Agona foram isolados em apenas uma coleta.

Os nove isolados de *Salmonella* sp. não tipáveis foram encontrados nas três primeiras coletas, exceto na quarta coleta.

4.4. Resistência dos isolados de *Salmonella* sp. antimicrobianos

Com relação à resistência a antimicrobianos, 60,8% dos isolados testados apresentaram perfil de multiresistência (MR), ou seja, os isolados que foram resistentes a 4 ou mais dos 14 antimicrobianos testados. A percentagem de amostras com perfil MR, porém, variou entre as coletas de 48% até 92% (Figura 7).

A avaliação da contribuição dos isolados das amostras de conteúdo intestinal e produto final, com perfil MR ou não estão na Figura 8.

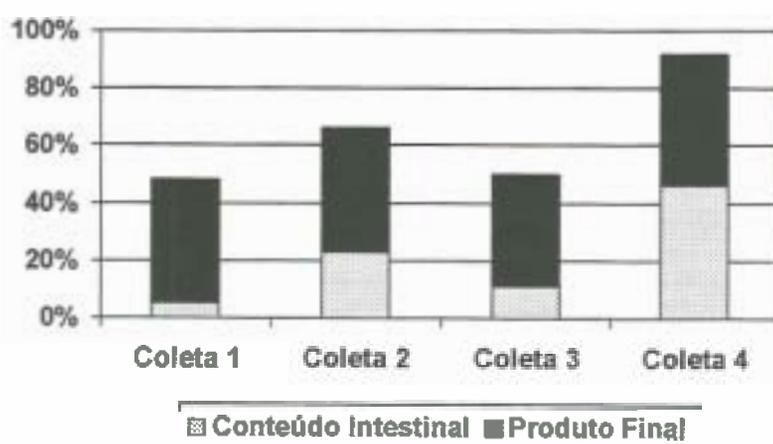


FIGURA 7: Percentual de isolados com perfil MR em cada coleta.

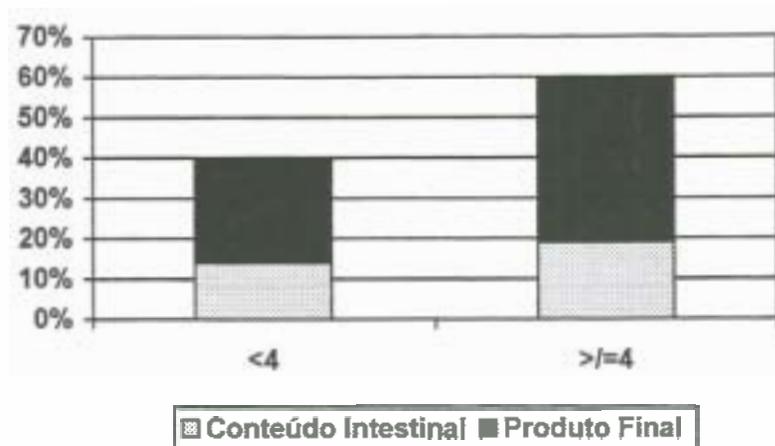


FIGURA 8: Contribuição dos isolados com perfil MR e resistentes a menos de quatro antimicrobianos, de conteúdo intestinal e produto final, na composição do universo amostral.

TABELA 2: Número de isolados de cada sorovar de *Salmonella* com perfil MR.

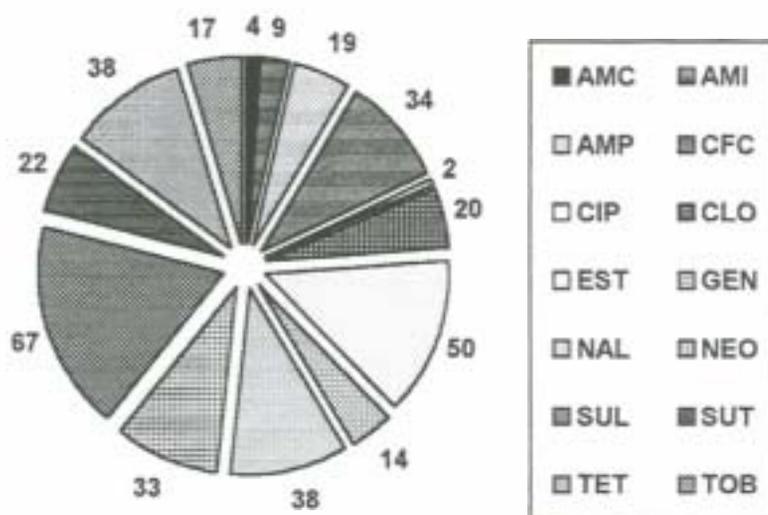
Sorovar	Número de isolados
Agona	1
Orion	1
Mbandaka	3
Derby	5
Minnesota	5
Typhimurium	5
<i>Salmonella</i> sp.	7
Bredeney	9
Panama	21

O sorovar que apresentou o maior número de isolados com perfil de MR foi o Panama, o qual foi também o sorovar isolado mais frequentemente durante o experimento. Apesar de ter sido o mais encontrado, a proporção de

multiresistentes não foi tão alta como no caso do sorovar Agona que teve seu único isolado com perfil MR (Tabela 2).

Os antimicrobianos aos quais um maior número de isolados apresentou resistência foram: sulfonamida (67), estreptomicina (50), nalidíxico (38) e tetraciclina (38) (Figura 9 e Tabela 3 e 4).

Dois isolados apresentaram resistência à ciprofloxacina (Figura 9), um do sorovar Typhimurium e outro do sorovar Panama (Tabela 3).



AMC= Amoxicilina+Ácido Clavulânico, AMI= Amicacina, AMP= Ampicilina, CFC= Cefaclor, CIP= Ciprofloxacina, CLO= Cloranfenicol, EST= Estreptomicina, GEN= Gentamicina, NAL= Ácido Nalidíxico, NEO= Neomicina, SUL= Sulfonamida, SUT= Clotrimoxazol, TET= Tetraciclina e TOB= Tobramicina.

FIGURA 9: Número de isolados de *Salmonella* sp. resistentes a cada antimicrobiano.

TABELA 3: Número de isolados de amostras de produto final, demonstrados por sorovar, resistentes a cada antimicrobiano.

Sorovar	n	Antimicrobianos													
		SUT	TET	NAL	AMI	CLO	TOB	EST	SUL	GEN	CFC	AMC	AMP	NEO	CIP
Panama	24	2	3	10	1	1	3	18	24	5	11	0	4	12	1
Bredenev	13	2	3	6	1	4	1	5	9	1	6	0	3	3	0
<i>Salmonella</i> sp.	8	3	6	4	1	4	2	4	5	0	5	2	3	3	0
Derby	4	0	4	1	1	0	0	4	3	0	0	0	1	3	0
Minnesota	4	1	1	1	0	2	0	2	3	1	0	0	0	2	0
Typhimurium	4	2	4	3	1	0	1	1	3	0	2	1	0	0	1
Mbandaka	3	0	2	2	0	0	2	3	2	1	2	1	0	0	0
Ohio	2	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0
Total	62	10	24	27	5	11	10	37	49	8	26	4	11	25	2

AMC= Amoxicilina+Ácido Clavulânico, AMI= Amicacina, AMP= Ampicilina, CFC= Cefactor, CIP= Ciprofloxacina, CLO= Cloranfenicol, EST= Estreptomicina, GEN= Gentamicina, NAL= Ácido Nalidíxico, NEO= Neomicina, SUL= Sulfonamida, SUT= Clotrimoxazol, TET= Tetraciclina e TOB= Tobramicina.

TABELA 4: Número de isolados de amostras de conteúdo intestinal, demonstrados por sorovar, resistentes a cada antimicrobiano.

Sorovar	n	Antimicrobianos													
		SUT	TET	NAL	AMI	CLO	TOB	EST	SUL	GEN	CFC	AMC	AMP	NEO	CIP
Panama	9	4	0	4	0	0	0	4	4	1	4	0	2	0	0
Bredenev	5	2	3	2	2	4	2	3	4	2	0	0	3	3	0
Typhimurium	5	3	4	0	0	3	1	1	3	0	0	0	0	0	0
Minnesota	3	0	1	2	1	2	1	2	2	0	2	0	1	1	0
Derby	2	2	2	1	0	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0
Mbandaka	2	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
Orion	2	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
Agona	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
<i>Salmonella</i> sp.	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
Total	30	12	14	10	4	10	7	13	18	6	8	0	9	8	0

AMC= Amoxicilina+Ácido Clavulânico, AMI= Amicacina, AMP= Ampicilina, CFC= Cefactor, CIP= Ciprofloxacina, CLO= Cloranfenicol, EST= Estreptomicina, GEN= Gentamicina, NAL= Ácido Nalidíxico, NEO= Neomicina, SUL= Sulfonamida, SUT= Clotrimoxazol, TET= Tetraciclina e TOB= Tobramicina.

Na primeira coleta, foram encontrados 10 isolados com perfil MR destes, um foi proveniente de amostras de conteúdo intestinal e 9 de produto final (cortes de pernil) (Figura 8). Os isolados de *Salmonella* sp. não tipáveis foram os que mais apresentaram perfil MR. Um maior número de isolados apresentaram resistência a sulfonamida e a tetraciclina.

Na segunda coleta, encontrou-se 20 isolados com perfil MR, sendo 7, provenientes de amostras de conteúdo intestinal e 13 de produto final

(Figura 8). Nesta coleta o sorovar que mais apresentou perfil MR foi o Panama. A maioria dos isolados apresentaram resistência ao ácido nalidíxico, cefador e sulfonamida.

Na terceira coleta, observou-se que 14 isolados apresentaram perfil MR. Destes, 3 foram provenientes de amostras de conteúdo intestinal e 11 de produto final (Figura 8). O sorovar Panama foi o que apresentou o maior número de multiresistentes. Os antimicrobianos que tiveram o maior número de isolados resistentes foram estreptomicina, neomicina e sulfonamida.

Na quarta coleta, observou-se que 12 isolados apresentaram perfil MR. Destes, 6 foram encontrados em amostras de conteúdo intestinal e 6 em produto final (Figura 8). Os sorovares Bredeney e Derby apresentaram todos os isolados multiresistentes, nesta coleta. Os antimicrobianos que tiveram o maior número de isolados resistentes foram estreptomicina, neomicina, sulfonamida e tetraciclina.

4.5. Perfis de resistência a antimicrobianos dos isolados de *Salmonella* sp.

No total, foram encontrados 72 perfis de resistência nas amostras de *Salmonella* sp. isoladas (Apêndices 1 e 4).

Os perfis mais encontrados entre os isolados foram:

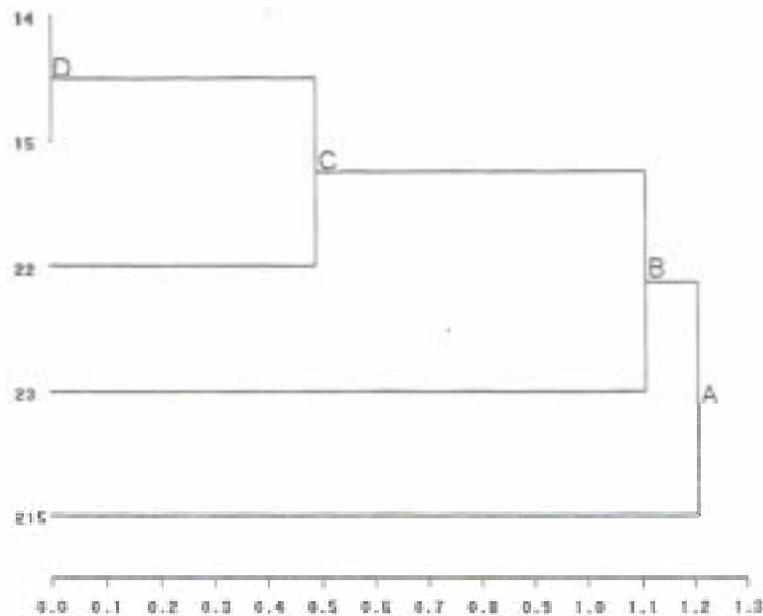
- perfil 1 (sensibilidade a todos os antimicrobianos), demonstrado por 9 isolados;
- perfil 29 (CFC, EST, NAL e SUL), apresentado por 5 isolados;
- perfil 4 (TET), apresentado por 4 isolados;

- perfil 57 (AMP, CLO, EST, NEO, SUL e TET), apresentado por 3 isolados;
- e os perfis 5 (CFC E SUL), 19 (EST, NEO e SUL) e 32 (EST, GEN, NEO e SUL) apresentados por 2 isolados cada.

4.6. Distância entre os isolados de *Salmonella* a partir dos perfis de resistência a antimicrobianos, demonstrados por sorovar e por coleta

Utilizando-se o perfil de resistência a antimicrobianos as linhagens de *Salmonella* pertencentes ao mesmo sorovar e isoladas numa mesma coleta, foram comparadas e agrupadas como demonstrado nas Figuras 10 até 16.

Na primeira coleta, os isolados de *Salmonella* Typhimurium, encontrados em amostras de conteúdo intestinal e produto final, formaram 4 agrupamentos (Figura 10). Os isolados 14 e 15, ambos de conteúdo intestinal, apresentaram um índice de similaridade de 100%, sendo colocados no mesmo grupo. Por outro lado este grupo não foi colocado próximo daqueles que incluíram as amostras de produto final (A-C), os índices de similaridade entre as amostras estão apresentados no Apêndice 5.

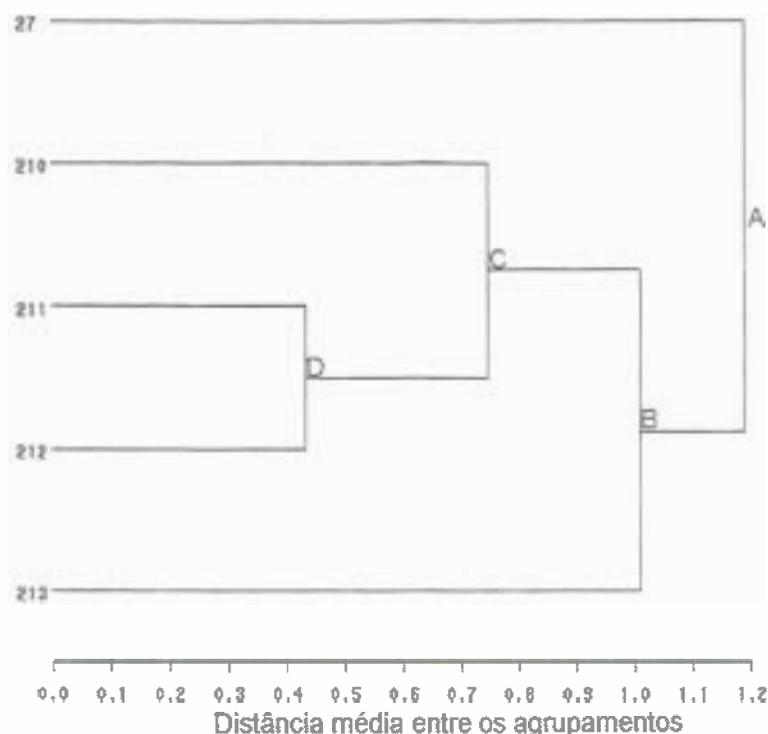


Distância média entre os agrupamentos

14 e 15: conteúdo intestinal; 22, 23 e 215: produto final (cortes de pernil).

FIGURA 10: Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Typhimurium, encontrados no conteúdo intestinal e no produto final na primeira coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos.

Já os isolados de *Salmonella* Bredeney da primeira coleta, encontrados apenas no produto final, são, possivelmente, de linhagens distintas. Houve a formação de quatro agrupamentos distantes com os índices de similaridade apresentados no Apêndice 6, estando mais próximos apenas os isolados 211 e 212, com 67% de similaridade entre eles (Figura 11).

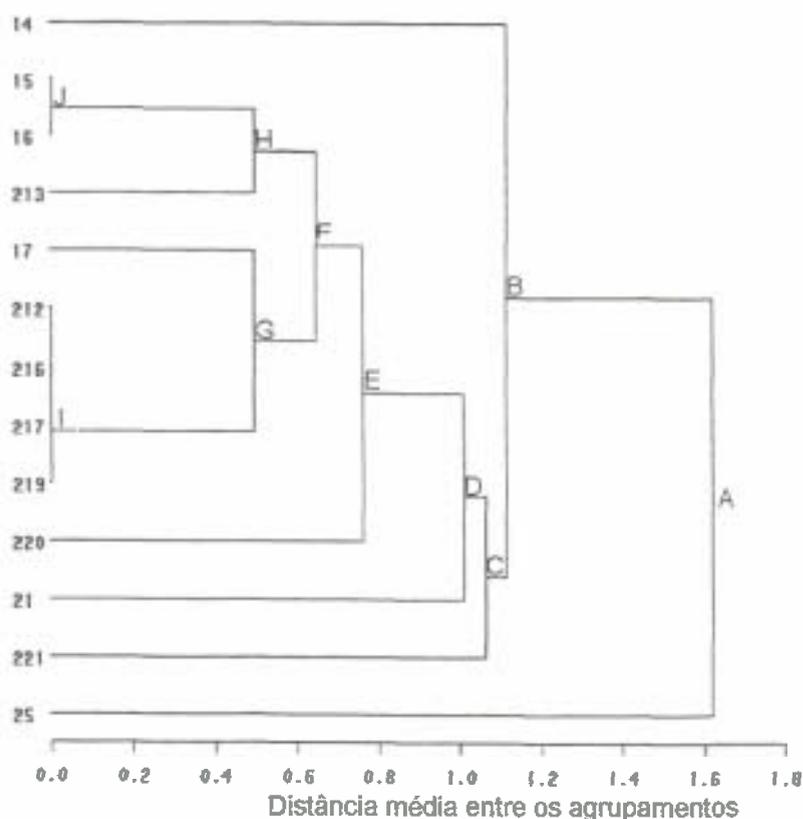


27, 210, 211, 212 e 213: produto final (cortes de pernil).

FIGURA 11: Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Bredeney, encontrados no produto final na primeira coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos. Analisando-se a similaridade entre os isolados do sorovar Panama

encontrados em amostras de conteúdo intestinal e produto final na segunda coleta (Figura 12), observou-se a formação de dez agrupamentos. Em dois agrupamentos (I e J), houve 100% de similaridade entre os membros de cada grupo, mas não quer dizer que os grupos tenham similaridade entre eles. No agrupamento J, observou-se que os isolados 15 e 16, provenientes de conteúdo intestinal, possivelmente, pertenciam a mesma linhagem, pois apresentaram um índice de similaridade de 100%, como demonstrado no Apêndice 7. Enquanto, no agrupamento I, os isolados 212, 216, 217 e 219, todas de pernil, possivelmente pertençam a mesma linhagem por apresentarem um índice de similaridade de 100%.

No agrupamento H, observa-se que estão presentes, além de isolados de conteúdo intestinal (agrupamento J), uma amostra (213) de produto final. Da mesma forma, no agrupamento G encontram-se as amostras de pernil (agrupamento I) e uma (17) de conteúdo intestinal. Estes grupos estão dentro do agrupamento F e segundo a matriz de similaridade (Apêndice 7), as amostras que fazem parte destes agrupamentos possuem entre 89 e 91% de similaridade entre elas.

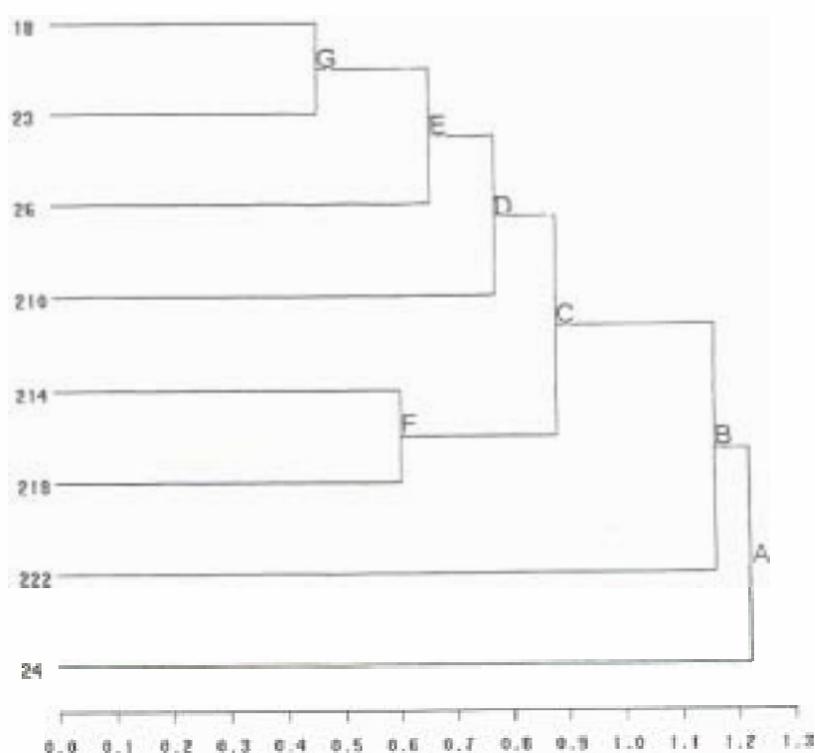


14, 15, 16 e 17: conteúdo intestinal; 21, 25, 212, 213, 216, 217, 219, 220 e 221: produto final (cortes de pernil).

FIGURA 12: Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Panama, encontrados no conteúdo intestinal e no produto final na segunda coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos.

Também na segunda coleta, os isolados de *Salmonella Bredeney* encontrados em conteúdo intestinal e produto final, formaram 7 agrupamentos

(Figura 13). A única amostra isolada de conteúdo intestinal (18) esteve mais próxima da amostra (23) de pernil, com 80% de similaridade entre elas (Apêndice 8). Entretanto, todas as amostras desse sorovar isoladas de pernil não apresentaram-se em agrupamentos próximos, indicando pouca similaridade entre si.



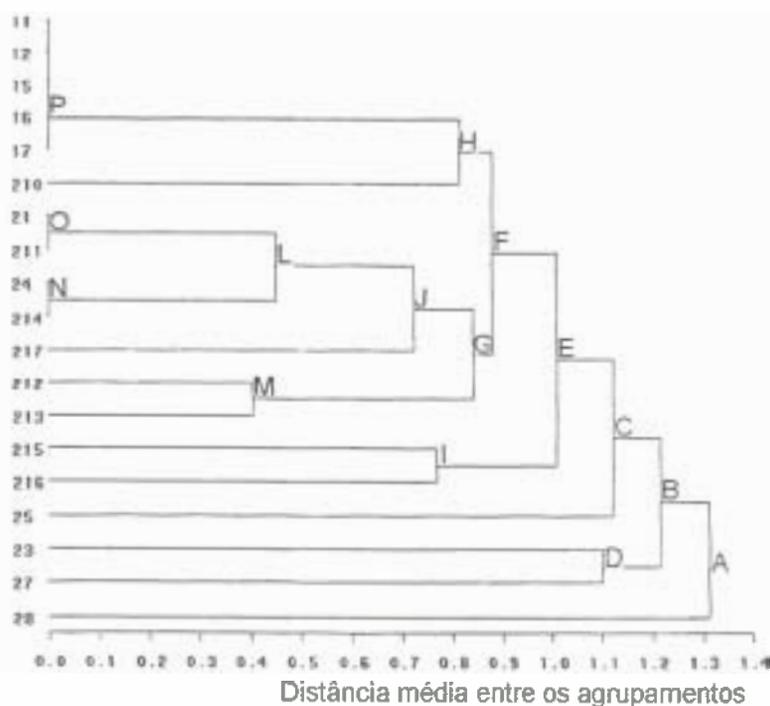
Distância média entre os agrupamentos

18: conteúdo intestinal; 23, 24, 26, 210, 214, 218 e 222: produto final (cortes de pernil).

FIGURA 13: Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Bredeney, encontrados no conteúdo intestinal e no produto final na segunda coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos.

Na terceira coleta, as amostras do sorovar Panama, das amostras de conteúdo intestinal e produto final formaram 15 agrupamentos (Figura 14). Observou-se que todas as amostras de conteúdo intestinal, possivelmente

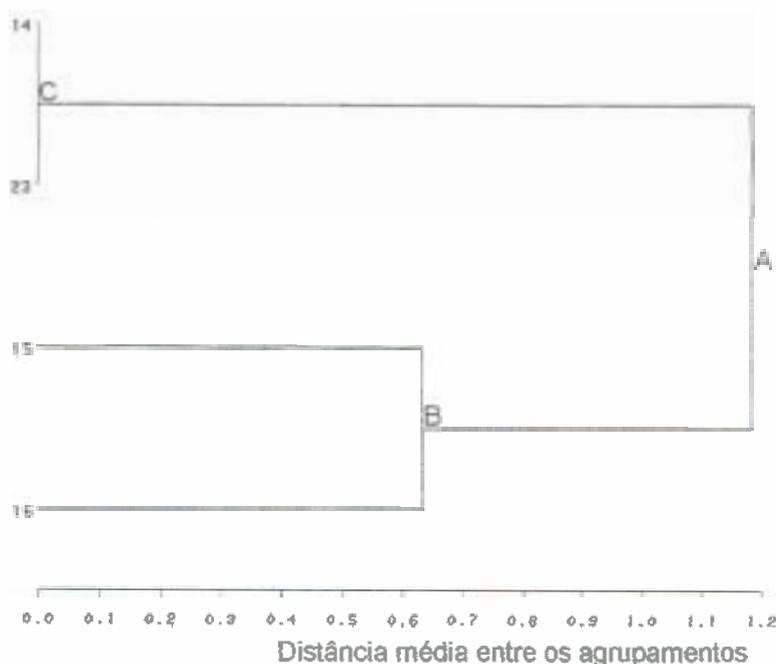
pertencem a mesma linhagem, pois todas foram colocadas dentro do mesmo grupo (agrupamento P). Nas amostras de produto final, houve 100% similaridade, como observa-se no Apêndice 9 entre os isolados 21 e 211 (agrupamento O), o mesmo índice foi também observado entre os isolados 24 e 214 (agrupamento N). Nos demais isolados, houveram menores graus de similaridade. Da mesma forma, o agrupamento composto de amostras de conteúdo intestinal (agrupamento P) esteve distante dos agrupamentos formados por amostras de pernil. As amostras de conteúdo intestinal não apresentaram qualquer similaridade entre as amostras de pernil (Apêndice 9).



11, 12, 15, 16 e 17: conteúdo intestinal; 21, 23, 24, 25, 27, 28, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216 e 217: produto final (cortes de pernil).

FIGURA 14: Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Panama, encontrados no conteúdo intestinal e no produto final na terceira coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos.

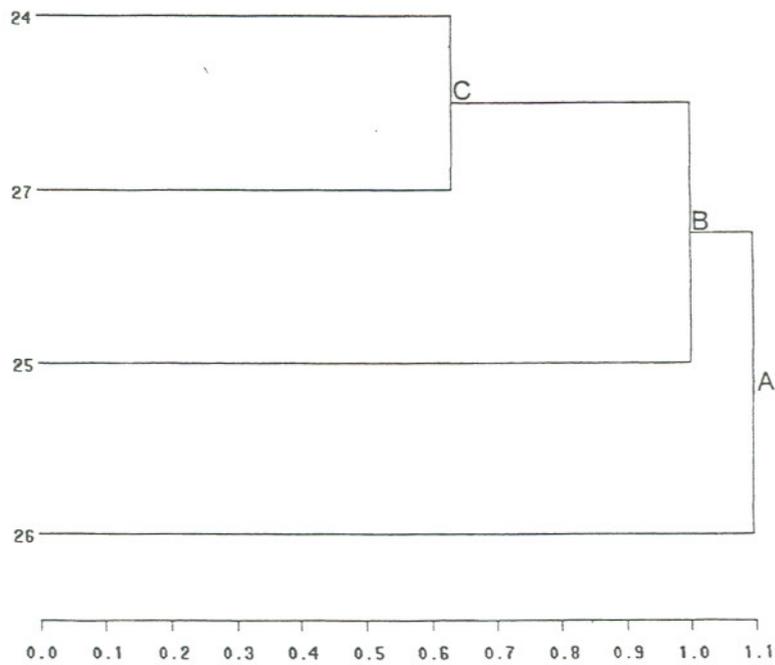
Na quarta coleta, quando avaliou-se a similaridade entre os isolados de *Salmonella* Bredeney, houve a formação de três agrupamentos (Figura 15). O agrupamento C foi composto pelos isolados 14 (conteúdo intestinal) e 23 (pernil), no Apêndice 10 observa-se 100% de similaridade entre estas amostras. Esta foi a única ocasião em que amostras isoladas de animais abatidos e do produto final foram identificadas como totalmente similares.



14, 15 e 16: conteúdo intestinal; 23: produto final (cortes de pernil).

FIGURA 15: Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Bredeney, encontrados no conteúdo intestinal e no produto final na quarta coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos.

Quando analisou-se os isolados de *Salmonella* Derby do produto final, na quarta coleta, observou-se a formação de três agrupamentos com isolados distintos e, relativamente, distantes entre si (Figura 16). Entretanto os isolados que formaram o agrupamento C, ou seja, as amostras 24 e 27, apresentaram 89% de similaridade entre elas (Apêndice 11).



Distância média entre os agrupamentos

24, 25, 26 e 27: produto final (cortes de pernil).

FIGURA 16: Dendrograma representando a distância entre os isolados do sorovar Derby, encontrados no produto final na quarta coleta. A distância entre os isolados foi avaliada pelo perfil de resistência a antimicrobianos.

5.DISSCUSSÃO

A prevalência de 46,87% de *Salmonella* sp. encontrada nos suínos abatidos neste estudo, demonstra que os animais entram no frigorífico portadores de *Salmonella* sp., ou são contaminados por outros animais, com os quais entraram em contato. Para tanto, pelo menos um animal tem que ter vindo contaminado da granja para disseminar *Salmonella* sp. entre os outros, que até então eram livres do microrganismo. Neste sentido, diversos autores (van der Wolf et al., 2001a; Berends et al., 1996; Swanenburg et al., 2001; e Swanenburg, 2000) concluíram que o estresse causado pelo transporte e o contato dos animais de rebanhos vindos de locais diferentes aumentam a possibilidade de excreção de *Salmonella* sp. pelos portadores, tornando-se, assim, origem de contaminação junto àqueles rebanhos no qual foram introduzidos.

No presente trabalho, avaliou-se a presença da bactéria no conteúdo intestinal dos animais ao abate. No entanto, a prevalência de *Salmonella* sp. nos animais, poderia ser ainda maior, pois foram considerados apenas os animais que estavam excretando *Salmonella* sp. no momento do abate. No entanto, muitos dos índices elevados presentes na literatura são de soroprevalência, o que segundo van der Wolf et al. (2001b), informa que os

animais entraram, em algum momento de sua vida, em contato com o microrganismo. Entretanto, animais soropositivos para *Salmonella* sp. podem tornar a excretá-la em momentos de estresse, como, por exemplo, durante o transporte e a espera para o abate.

Em estudo que avaliou os fatores de risco envolvidos na prevalência sorológica de *Salmonella* sp. em rebanhos de suínos de terminação na Holanda, van der Wolf et al. (2001b) encontraram pelo menos uma amostra soropositiva em 89% dos rebanhos. Esses resultados foram associados a fatores como ração contaminada, deficiências na higienização do ambiente, tamanho do rebanho, tipo de promotor de crescimento contido na ração, entre outros.

A presença de animais contaminados/excretando *Salmonella* sp. no momento do abate, assim como a presença de animais com sorologia positiva, ou seja, portadores, na linha de abate, pode indicar um alto número de animais positivos sendo abatidos e um alto risco de contaminação de carcaças no final da linha de abate (van der Wolf et al., 2001a).

Índices semelhantes de animais excretadores foram encontrados por Lettelier et al. (1999), ao avaliarem conteúdo intestinal de suínos ao abate no Canadá. Assim como no presente trabalho, foi utilizada análise bacteriológica para detecção do microrganismo. Stege et al. (2000), na Dinamarca, encontraram 21% dos rebanhos estudados com a presença de *Salmonella* sp. em fezes presentes no piso das baias. Os autores dinamarqueses realizaram, ainda, avaliação sorológica dos animais provenientes dos mesmo rebanhos. Nesta avaliação, encontraram 91 dos 96 rebanhos positivos para *Salmonella*

sp. em três diferentes níveis de contaminação. Utilizando a mesma metodologia de avaliação sorológica e também na Dinamarca, Alban et al. (2002) encontraram 39,4% dos rebanhos positivos.

Em estudo realizado em rebanhos suínos para avaliar o Programa de Controle de *Salmonella* na Dinamarca, Christensen et al. (2002) encontraram uma prevalência de 11,4% de *Salmonella* sp. em amostras de conteúdo intestinal, com 7,1% dos isolados do sorovar Typhimurium, em animais ao abate. Tanto para prevalência de *Salmonella* sp. como para prevalência de *Salmonella* Typhimurium, os valores encontrados no estudo citado foram, menores que os encontrados no presente trabalho, que foram 46,87% e 16,7%, respectivamente. Isto demonstra a necessidade de instalação de um programa de controle no Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul.

Os dados provenientes de países diferentes, de rebanhos de diversos tamanho e informações que possam ser biologicamente e epidemiologicamente relevantes, podem auxiliar a entender e interpretar as variações na ocorrência de *Salmonella* sp. (Carstensen et al., 1998).

Entre os primeiros pesquisadores a preocupar-se com o problema da *Salmonella* sp. em suínos no Brasil, está Neiva (1946), que pesquisou a ocorrência de *Salmonella* sp. em conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos de animais abatidos em São Paulo, encontrando 41,5% deles positivos. Apesar de seu resultado final ter sido semelhante aos achados no presente trabalho, quando foi avaliada somente matéria fecal, encontrou-se 26% das amostras positivas. Levando-se em consideração a data do trabalho do citado autor,

percebe-se quão antigo é o problema da *Salmonella* sp. em rebanhos de suínos no nosso país.

Em estudo que avaliou suínos ao abate, Lázaro et al. (1997) no Rio de Janeiro, pela análise de estruturas linfáticas, encontraram 25,5% dos animais positivos para *Salmonella* sp. Estes dados demonstram mais uma vez que os índices de suínos positivos abatidos no nosso país são elevados e devem ser controlados.

Bessa (2001) em estudo que avaliou a prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Rio Grande do Sul, encontrou uma prevalência de 55,66% de suínos positivos para *Salmonella* sp. no momento do abate. Esses valores são coincidentes com o encontrados neste trabalho e demonstram que o problema da *Salmonella* sp., em suínos no Rio Grande do Sul é real e deve ser levado a sério, pois acarreta perdas econômicas para o mercado interno e de exportação de carne 'in natura' e derivados de produtos suínos.

Também no Rio Grande do Sul, Weiss et al. (1999), haviam encontrado, anteriormente, em torno de 10% das amostras de conteúdo intestinal e de linfonodos mesentéricos, positivas para *Salmonella* sp.

Os 49,59% de cortes de pernil com presença de *Salmonella* sp. demonstram que, apesar do microrganismo estar no intestino do animal, ele pode chegar ao produto final por contaminação cruzada ocorrida durante evisceração ou em algum outro momento durante o abate ou processamento.

Magnani et al. (2000), em Chapecó – SC, avaliaram carne suína *in natura* e encontraram 6% dos cortes positivos para *Salmonella* sp., valor inferior ao encontrado neste estudo. Ainda assim, esses produtos foram

considerados impróprios para o consumo. Valor semelhante ao do presente trabalho foi encontrado em estudo conduzido por Giombelli & Silva (2001) também em Chapecó, onde os autores encontraram 50,5% das amostras de carne suína *in natura* positivas para *Salmonella* sp.

Na Bélgica, o estudo conduzido por Korsak et al. (1998) encontraram 27% das carcaças suínas positivas para *Salmonella* sp. Neste trabalho, apesar da técnica utilizada ter sido suabe e os autores terem utilizado 'pool' de 5 amostras, enquanto no nosso estudo foi utilizado 'pool' de 3 amostras e terem sido utilizadas porções do produto, em ambos foi utilizada a porção denominada como pernil suíno. Swanenburg (2000), avaliando a eficiência das técnicas de suabe e de 'cork bore' que corta uma porção do material, concluiu que a técnica de 'cork bore' demonstra maior sensibilidade. Portanto, a técnica utilizada no presente estudo é mais eficiente, por utilizar uma porção do produto, o que aumenta a sensibilidade na detecção do microrganismo.

Berends et al. (1997), em estudo conduzido na Holanda, estimaram que a incidência de *Salmonella* sp. em carne suína picada varia entre 5 e 40%, o limite máximo se aproxima dos valores do presente estudo, entretanto os mesmos autores quando estimaram a incidência do microrganismo em salsichas cruas de origem suína, encontraram valores variando entre 40 e 70%. Isto, possivelmente, se deve ao fato do embutido ser mais processado que a carne.

Escartin et al. (1999), avaliando prevalência de *Salmonella* sp. em Churizo, um produto de origem suína, no México, encontraram 88,3% de amostras positivas. Avaliando lingüiça frescal de origem suína, no Rio de

Janeiro, Chaves et al. (2000), encontraram 10% das amostras positivas para *Salmonella* sp. Lobo et al. (2001) encontraram em salames coloniais, em Santa Maria – RS, Brasil, 5% das amostras positivas para *Salmonella* sp. Embora, os produtos avaliados sejam diferentes, são todos de origem suína.

Em estudo realizado no México, Escartin et al. (2000) concluíram que a contaminação microbiana na carne ocorre principalmente na sua superfície e inicia no abatedouro, estendendo-se para os pontos de venda, onde serão manipulados, o que poderá promover a contaminação cruzada.

A correlação entre a prevalência de *Salmonella* sp. nos animais durante o abate e a presença da bactéria no produto final (cortes de pernil) existe. Observou-se que estes valores são estatisticamente iguais, ou seja, o número de animais que entram excretando *Salmonella* sp. no frigorífico é o mesmo de produto contaminado no final da linha de produção.

Portanto, constatou-se, assim como Berends et al. (1996) que, o problema da infecção por *Salmonella* sp. começa na granja e continua por toda cadeia de produção.

Durante o experimento, somente a localidade B (Apêndice 2), uma das granjas de terminação que fazem parte da cadeia de produção desta empresa, foi coletada duas vezes em dois dias distintos, na primeira e na última coleta. No entanto, estas duas coletas foram as que apresentaram as menores prevalências. Entretanto, esta localidade colaborou com uma amostra positiva em cada uma das coletas. As demais 14 localidades foram coletadas somente uma vez (Apêndice 2).

Portanto, as variações entre as prevalências de cada dia podem ser associadas às diferenças de níveis de contaminação, ou diferentes prevalências entre as granjas (localidades).

A presença de *Salmonella* sp. nos cortes de pernil suíno, representam grande preocupação para a indústria e para a saúde pública. Na indústria a rejeição do produto pelo mercado externo e interno, envolve a descrédito da empresa e a imagem do país no mercado externo. Para saúde pública, um caso de surto pode envolver prejuízos não só para a saúde do consumidor como também para a economia, com despesas de internação, tratamento e produção, pois o consumidor estando doente estará impossibilitado de comparecer ao trabalho (Rubino, 1997). Em estudo realizado por Rubino (1997) que avaliou o impacto econômico da salmonelose humana, foi estimado que nos Estados Unidos, são gastos a cada ano, U\$675 por paciente quando não hospitalizados e U\$2,025 por paciente quando são hospitalizados.

Deve-se considerar, no entanto, que, o alimento em questão, no caso o pernil suíno, não será ingerido cru, ou seja, será submetido a tratamento térmico. Este tratamento térmico irá reduzir, ou mesmo eliminar as bactérias presentes no alimento, pois as células de *Salmonella* sp. tornam-se inviáveis à temperatura de 60°C. Portanto, o maior risco para a saúde do consumidor não é representado pelo consumo do produto que deu origem à contaminação e sim pela contaminação cruzada que pode ocorrer durante o preparo do alimento. A transferência do microrganismo para outros alimentos é a principal causa de surtos, principalmente a transferência para alimentos que serão

ingeridos crus, por exemplo, ingredientes que serão utilizados para o preparo de saladas.

Escartin et al. (2000), concluíram com seu estudo conduzido no México, que a carne suína crua é uma potencial fonte de contaminação cruzada em cozinhas domésticas, estabelecimentos que servem refeições e nas indústrias de alimentos.

Gorman et al. (2002), em estudo que avaliou a contaminação cruzada em cozinhas domésticas na Irlanda, observaram que os microrganismos são transferidos do alimento contaminado para outros locais na cozinha. Neste estudo, a *Salmonella* sp. foi isolada de 2 dos 12 sítios amostrados nas cozinhas irlandesas, comprovando que existe a transferência de células, possivelmente patogênicas, do produto para o ambiente, nas cozinhas domésticas.

Por esta razão, resolveu-se avaliar o nível de contaminação dos produtos analisados no presente trabalho, já que se encontrou um elevado percentual de produto com presença de *Salmonella* sp. Para tanto realizou-se a quantificação de *Salmonella* sp. em duas amostras de corte de pernil suíno, pois nosso objetivo era apenas saber até que ponto o produto analisado poderia representar, ao entrar no mercado, um risco à população consumidora. O valor encontrado em uma das amostras foi abaixo do número necessário para desenvolver uma gastroenterite em um indivíduo saudável, no entanto, a segunda apresentou os valores máximos, ≥ 110 NMP/g, que a técnica utilizada permitia determinar. Estas células podem se multiplicar e chegar a números elevados o bastante para causar doença em um indivíduo e até mesmo um

surto (Berends et al., 1997). Deve-se considerar, também, que existem alguns sorovares de *Salmonella* sp., que não necessitam de elevado número de células para causar prejuízos à saúde humana.

Neste experimento observou-se uma grande diversidade de sorovares, tanto no conteúdo intestinal dos animais ao abate como no produto final, isto demonstra que as fontes de contaminação dentro da granja e dentro do frigorífico são várias.

A grande diversidade de sorovares observada nos animais oriundos de uma mesma propriedade, indica uma possível existência de diversidade nos animais individualmente, ou seja, pode haver a presença de mais de um sorovar num único animal. Fato preocupante, além do problema da *Salmonella* em si (como contaminação), é que, em caso de surto, a dificuldade para realizar uma busca epidemiológica pela origem da contaminação torna-se maior. Existem informações na literatura que associam a diversidade de sorovares com a introdução de outros animais, vindos de diferentes granjas (van der Wolf et al., 2001a). Estes animais poderiam ser portadores de sorovares de *Salmonella* sp. que já eram presentes na granja ou introduzir novos sorovares no grupo de animais.

Em estudo realizado nos EUA, Funk et al. (2001) concluíram, que a alta diversidade de sorovares dificultam a condução de estudos epidemiológicos na granja, podendo resultar em conclusões não confiáveis e coloca as práticas de manejo como possíveis importantes fatores de risco para contaminação por *Salmonella* em suínos.

Em seu estudo, Bessa (2001) encontrou como sorovar predominante Typhimurium, assim como Stege et al. (2000). No presente estudo houve predominância do sorovar Panama, seguido por Bredeney, que no estudo de Bessa (2001) ficou como o terceiro mais encontrado. O sorovar Panama que foi o predominante neste estudo, ficou em quinta posição, no estudo conduzido por Bessa (2001).

No estudo conduzido por Magnani et al. (2000), os sorovares mais encontrados em carne suína *in natura*, que também foram encontrados neste estudo, foram Agona e Typhimurium. Já Lázaro et al. (1997), encontraram Typhimurium, Derby e Panama, entre outros. Lettelier et al. (1999) encontraram Typhimurium, Derby, Agona e Mbandaka. Escartin et al. (1999) isolaram Derby, Typhimurium, Minnesota e Ohio, entre outros.

Swanenburg (2000), na Holanda, encontrou entre seus isolados os sorovares Typhimurium, Panama, Derby e Mbandaka, entre outros. Interessante foi o fato de ter encontrado o sorovar Panama como o segundo mais isolado, precedido pelo Typhimurium. O autor encontrou 27 isolados de *Salmonella* Panama em seu estudo, enquanto no presente encontrou-se 33 isolados do mesmo sorovar, talvez indicando que esse sorovar possa vir a ser significativa para a suinocultura mundial.

Em estudo conduzido por van Winsen et al. (2001), na Holanda, foi monitorado biológica e sorologicamente a transmissão de sorovares de *Salmonella* sp., entre eles o sorovar Panama, e concluiu-se que este é um sorovar com padrão de transmissão baixa em relação aos demais sorovares

avaliados no estudo, entre eles Typhimurium. Neste estudo, o sorovar Livingstone demonstrou ter transmissão mais evidente e mais rápida.

Esta informação é controversa aos nossos resultados que demonstram que o sorovar Panama pareceu disseminar-se facilmente, pois foi o sorovar discrepantemente predominante em duas coletas. O que demonstra que apresentou uma excelente capacidade de transmissão entre os animais e disseminação dentro do frigorífico, provavelmente através da contaminação cruzada entre as carcaças.

Muitos dos sorovares isolados neste estudo, foram em outros trabalhos isolados de amostras de origem humana, ou seja, são potenciais causadores de surtos. Em agosto de 1998, na Espanha, o sorovar Panama, foi isolado de pacientes que apresentavam quadro de gastroenterite, no mesmo mês outros dois surtos foram registrados, nesses também houve associação com o sorovar Panama (Soto et al., 2001).

Em outro estudo conduzido na Espanha por Cruchaga et al. (2001), foram isolados 284 amostras de *Salmonella* Typhimurium, entre os 1051 isolados, todos de origem humana. Beaudin et al. (2002), isolaram 756 amostras de *Salmonella* Typhimurium de origem humana, animal e de alimentos suspeitos de serem as causa de surtos de salmonelose, provenientes da Grã Bretanha, EUA e Canadá. Destas, 240 foram de origem humana, e também foram identificadas como sendo da linhagem DT 104 do sorovar Typhimurium, reconhecida por apresentar perfil de multiresistência. Apesar de, no presente trabalho não terem sido encontradas amostras de Typhimurium com típico perfil ACSSuT, ou seja, resistentes a ampicilina,

cloranfenicol, estreptomicina, sulmetoxazol e tetraciclina, apresentado pelas linhagem DT 104, foram isoladas amostras de *Salmonella* Typhimurium, comumente associado a surtos de origem alimentar.

Em abril de 1983, em um surto na cidade de Araraquara em São Paulo, houve a identificação do sorovar Bredeney como sendo o agente causal. O microrganismo foi isolado a partir de coproculturas humanas (Landgraf et al., 1985). Jahraus & Philips (1999), descreveram um surto causado por *Salmonella* Bredeney, em Shelby County, uma comunidade rural no Alabama, EUA.

Estas informações demonstram que os sorovares encontrados no presente estudo podem vir a causar problemas à população, principalmente por terem sido isolados de produto final.

Os sorovares apresentaram um grande número de isolados com perfil multiresistente (MR). O sorovar Ohio, isolado somente em uma coleta, em duas amostras de corte de pernil, não apresentou isolados com perfil MR. Entretanto, o sorovar Agona, isolado somente uma vez durante o experimento, em uma amostra de conteúdo intestinal, apresentou resistência a 9 dos 14 antimicrobianos testados (Tabela 4).

O sorovar Panama apresentou o maior número de isolados com perfil MR (Apêndice 3), além de também ter sido o sorovar mais isolado no experimento.

Em trabalho realizado por Soto et al. (2001), quando avaliaram o perfil de resistência de isolados de *Salmonella* Panama de surtos e casos esporádicos de salmonelose humana na Espanha, encontrou-se amostras do

sorovar Panama com perfil MR. Assim como no presente trabalho, também foi encontrado um grande número de isolados resistentes ao ácido nalidíxico.

O total de isolados com perfil MR, envolvendo todos os sorovares, foi de 60,8%. O agravante deste valor elevado é o fato do maior número de isolados com perfil MR ter sido isolado do produto final. Isto pode representar um risco à saúde do consumidor que, uma vez entrando em contato com este produto, pode vir a desenvolver uma salmonelose de difícil tratamento.

Vale a pena salientar a resistência à ciprofloxacina, encontrada em dois isolados, e o alto percentual de isolados resistentes ao ácido nalidíxico, fato também observado por Yang et al. (2002). Chama-se a atenção para a importância da ciprofloxacina, por este ser um antimicrobiano somente utilizado na medicina humana, inclusive para o tratamento de salmonelose. Estes dois antimicrobianos fazem parte da classe das quinolonas e especula-se que a resistência à ciprofloxacina possam estar ocorrendo pelo uso excessivo de outras quinolonas na medicina veterinária (Bager & Helmut, 2001; Beaudin et al., 2002; Threlfall, 2002).

Em estudo conduzido por Beaudin et al. (2002) em amostras de *Salmonella* Typhimurium DT 104, 35% destas apresentaram resistência a pelo menos 4 antimicrobianos. Apesar de, no presente estudo, não terem sido isoladas amostras da linhagem DT 104, encontrou-se 5 amostras do sorovar Typhimurium com perfil MR. Das amostras isoladas no trabalho dos autores 83 (35%) apresentaram-se resistentes a amoxicilina+ácido clavulânico, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina. Enquanto neste trabalho, as amostras do sorovar Typhimurium não apresentaram resistência a ampicilina, uma foi

resistente a amoxicilina+ácido clavulânico, três foram resistentes a cloranfenicol e oito foram resistentes a tetraciclina. Os autores encontraram 114 (47,5%) amostras com sensibilidade a todos os antimicrobianos, enquanto, no presente trabalho, encontrou-se somente 9 amostras com sensibilidade a todos os antimicrobianos. Entre estas, nenhuma foi do sorovar Typhimurium.

No mesmo trabalho, Beaudin et al. (2002) não encontraram resistência às quinolonas, enquanto neste estudo 38 (41%) apresentaram-se resistentes ao ácido nalidíxico e duas, o equivalente a 2%, resistentes a ciprofloxacina (De Moraes et al., 2000; Cruchaga et al. 2001, Beaudin et al., 2002).

Cruchaga et al. (2001) encontraram entre as amostras de *Salmonella* sp. isoladas de humanos, de alimentos e de animais, 44% delas com perfil MR. Entre as amostras, 93 eram isoladas de suínos e 22 de produtos de origem suína, sendo que o sorovar predominante entre os isolados foi o Typhimurium. Ao contrário dos resultados do presente estudo, os autores encontraram nos isolados provenientes de animais maior nível de resistência que nos isolados de alimentos. Confrontando-se os percentuais de resistência encontrados pelos autores com os achados no presente estudo, observou-se semelhança entre os valores para o ácido nalidíxico, estreptomicina e gentamicina.

Vários são os relatos na literatura sobre a associação entre o aumento da resistência a antimicrobianos demonstrada pelos microrganismos, com o aumento do consumo de antimicrobianos em animais criados para

produção de alimentos (Cruchaga et al., 2001; Teuber, 2001; Schwarz et al. 2001).

Apesar de haver uma diversidade de sorovares no experimento, observou-se uma predominância do sorovar Panama na segunda e terceira coletas. Isto sugeriria que, possivelmente a origem de contaminação fosse a mesma, não fosse o fato dos perfis de resistência a antimicrobianos terem demonstrado que as linhagens bacterianas eram diferentes. Sabe-se que a avaliação de perfil de resistência a antimicrobianos para demonstrar o grau de similaridade entre as linhagens bacterianas, não é o mais utilizado, pelo baixo poder discriminatório.

Olsen et al. (1993), revisaram técnicas de tipificação bacterianas genotípicas e fenotípicas. As técnicas genotípicas além de serem mais precisas também fornecem resultados mais rápidos. Entre estas técnicas estão a análise de perfil plasmidial, análise de plasmídios clivados por enzimas de restrição, reação em cadeia de polimerase (PCR), gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (Olsen et al., 1993 & Tsen et al., 2002), ERIC-PCR, REP-PCR (Versalovic et al., 1994), entre outras. Os métodos genotípicos são ferramentas que fornecem rápido resultado, sendo bastante úteis para análises epidemiológicas (Tsen et al., 2002, Swanenburg, 2000). Entre as técnicas de genotipificação mais utilizadas, no caso de *Salmonella* sp., estão, PFGE, considerado método padrão (Tsen et al., 2002), ERIC-PCR (Swanenburg, 2000) e REP-PCR proposto em Versalovic et al., (1994).

Entre as técnicas fenotípicas estão, sorotipificação, fagotipificação e resistência a antimicrobianos. Olsen et al. (1993) e Yang et al. (2002) comentam que, mesmo os métodos de fenotipificação tendo um poder discriminatório menor que os de genotipificação, são ainda bastante utilizados, inclusive como método paralelo, ou seja, utilizados como uma ferramenta a mais, aumentando a confiabilidade dos resultados.

Apesar disto, utilizando-se o perfil de resistência a antimicrobianos, demonstrou-se que a diversidade era não somente em nível de sorovares, mas também de linhagens.

Os dendrogramas podem demonstrar todas as diversas linhagens e inclusive as distâncias entre elas. Pode-se observar que os isolados de um mesmo sorovar encontrados em uma mesma coleta, do mesmo material, podem ser de linhagens distintas e distantes (Figura 10-16).

Na primeira, segunda e terceira coletas encontrou-se similaridade entre as amostras de *Salmonella* Panama, isoladas de conteúdo intestinal de animais distintos ou mesmo provenientes de lotes diferentes. Isto poderia indicar que houve uma fonte comum de contaminação para estes lotes de animais. Entre as prováveis fontes de contaminação poderiam ser citadas a origem dos animais de terminação, a ração fornecida aos animais e o local de permanência antes do abate. Considerando os estudos previamente relatados (Rostagno et al., 2001) as baias de descanso do frigorífico podem ser apontadas como as principais suspeitas. A desinfecção deficiente das baias antes da entrada dos animais propicia a permanência residual de *Salmonella* sp. Ao lado disto, sabe-se que aos trinta minutos os microrganismo ingeridos

pelos animais já alcançaram o intestino e em duas horas os linfonodos regionais (Fedorka-Cray et al., 1995, Hurd et al., 2001). Este fato reforça a importância do manejo pré-abate no controle da contaminação por *Salmonella* sp. no produto final.

Entretanto ao avaliar o agrupamento das linhagens de *Salmonella* Panama isoladas de produto final, observa-se que apesar de algumas amostras, na segunda e terceira coletas, terem alto índice de similaridade entre si, foram sempre distintas das linhagens de conteúdo intestinal. Esta distância variou, havendo isolados próximos ao grupo das linhagens de origem fecal, em todas as coletas (grupo C na primeira coleta; H na segunda; e grupos G e H na terceira coleta). Entre si os isolados de pemil também apresentaram distâncias variáveis em todas as coletas (Figura 10, 12 e 14). Este fato aponta para múltiplas fontes de contaminação para o produto final, proveniente da entrada de diferentes animais portadores no frigorífico, seguido de contaminação cruzada das carcaças e dos cortes durante o processamento.

O sorovar Bredeney, encontrado na primeira, terceira e quarta coleta, apresentou situação semelhante. Na primeira coleta foi isolado apenas de produto final, apresentando linhagens distintas com baixo grau de similaridade entre si. Na segunda coleta também houve predomínio de amostras isoladas de produto final, sendo o único isolado fecal agrupado próximo a um isolado de pemil (grupo G e Figura 13).

Finalmente, na quarta coleta observou-se a única ocasião em que um isolado de fezes apresentou 100% de similaridade (Apêndice 10) a um isolado de produto final (Figura 15 e Grupo C). Estes resultados indicam uma

provável contaminação cruzada proveniente de linhagens de *Salmonella* Bredeney oriundas de outros lotes de animais que não foram amostrados durante as coletas realizadas, ou de possível contaminação residual no ambiente do frigorífico. Entretanto, cabe salientar que segundo Berends et al. (1997) a contaminação residual do ambiente por *Salmonella* sp. tem importância apenas a primeira hora de abate ou processamento, a partir daí, a entrada de animais positivos e contaminação cruzada assumem o papel principal na presença do microrganismo no produto final. Considerando-se que o sorovar Bredeney tem sido o mais prevalente neste frigorífico em estudos anteriores ali realizados, pode-se pensar que existem linhagens deste sorovar circulando ao longo da cadeia produtiva deste sistema integrado.

Portanto, deve-se partir de uma investigação que inicie na granja e vá até o frigorífico, como o ponto de partida epidemiológica para um programa de controle de *Salmonella*, assim como foi feito em países europeus.

6.CONCLUSÕES

A partir dos resultados do presente estudo é possível concluir:

1. Uma considerável proporção dos suínos abatidos no frigorífico estudado estavam excretando *Salmonella* sp. nas fezes;
2. A introdução de *Salmonella* sp. no frigorífico resulta na presença do microrganismo no produto final, pernil suíno;
3. A maioria das amostras de *Salmonella* sp. isoladas de fezes e produto final apresentaram perfil de multiresistência a antimicrobianos;
4. Foi encontrada uma grande diversidade de sorovares encontrados, sendo os mais prevalentes Panama e Bredeney;
5. Foram encontradas diferentes linhagens de *Salmonella* sp. dentro de um mesmo sorovar;
6. A diversidade de linhagens encontrada indica múltiplas fontes de contaminação.

7.Considerações finais

Os resultados deste estudo refletem a necessidade de implementação de programas de controle de *Salmonella* sp. que previnam o microrganismo, da granja até o frigorífico e alertem os profissionais e o consumidor da importância de boas práticas de higiene.

A implementação de programas de controle de *Salmonella* sp. necessitam de trabalhos que incluam estudos longitudinais, que irão investigar as possíveis fontes de contaminação na granja, que é onde o problema inicia.

O treinamento dos profissionais envolvidos na indústria de produção suína, faz parte do programa de controle, pois o bom andamento de um projeto depende, também, do bom treinamento do pessoal envolvido.

Há muito a população consumidora já vem sendo alertada para o fato das contaminações provenientes de alimentos a que estão expostas. Estes alertas incluem principalmente a boa cocção dos alimentos, entretanto, deve ser também feito um alerta para a contaminação cruzada que pode ocorrer no momento do preparo dos alimentos.

Portanto, programas de controle de *Salmonella* sp. devem envolver a reestruturação das granjas que sofrem com o problema da *Salmonella* sp., o treinamento dos profissionais, isto inclui todos os que fazem parte de alguma

etapa desde a granja até o frigorífico, e a educação da população para as práticas de higiene.

9.APÉNDICES

Apêndice 1: Perfis de resistência a antimicrobianos apresentados pelos isolados de *Salmonella* sp. encontrados em amostras de conteúdo intestinal e produto final.

Perfil	Antimicrobianos testados				
1	SENSÍVEL A TODOS OS ANTIMICROBIANOS				
2	NEO				
3	SUL				
4	TET				
5	CFC	SUL			
6	EST	TET			
7	NAL	SUL			
8	NEO	SUL			
9	NEO	TET			
10	SUL	TOB			
11	SUT	TET			
12	AMP	CFC	SUL		
13	AMP	NAL	TET		
14	CFC	EST	SUL		
15	CLO	NEO	SUL		
16	CLO	SUL	NAL		
17	CLO	SUL	SUT		
18	EST	NAL	SUL		
19	EST	NEO	SUL		
20	GEN	SUL	TET		
21	NAL	NEO	SUL		
22	NAL	NEO	TOB		
23	SUL	SUT	TET		
24	AMI	AMP	EST	TOB	
25	AMI	CFC	EST	SUL	
26	AMI	EST	SUL	TET	
27	AMP	CFC	NEO	SUL	
28	AMP	EST	NEO	TET	
29	CFC	EST	NAL	SUL	
30	CFC	NAL	SUL	SUT	
31	CLO	SUL	SUT	TET	
32	EST	GEN	NEO	SUL	
33	EST	GEN	NEO	TOB	
34	EST	NAL	NEO	SUL	
35	EST	NEO	SUL	SUT	
36	NEO	EST	SUL	TET	
37	AMI	CLO	EST	NEO	SUL
38	AMP	CFC	CLO	NAL	SUT
39	AMP	CFC	EST	NAL	SUL
40	AMP	EST	GEN	NEO	SUL
41	CFC	CIP	EST	NAL	SUL
42	CFC	CLO	EST	NAL	SUL
43	CFC	EST	GEN	NAL	TOB
44	CFC	EST	NAL	SUL	SUT
45	CFC	EST	NAL	SUL	TOB
46	CFC	NAL	SUL	SUT	TET
47	CIP	EST	NAL	SUL	TET
48	CLO	EST	NEO	SUL	TET
49	CLO	EST	NEO	SUL	TOB

50	EST	GEN	NAL	SUL	SUT						
51	EST	NAL	NEO	SUL	TET						
52	AMC	CFC	NAL	SUL	SUT	TET					
53	AMI	CFC	NAL	SUL	TET	TOB					
54	AMI	EST	GEN	NEO	SUL	TET					
55	AMP	CFC	EST	NAL	SUL	SUT					
56	AMP	CFC	NAL	SUL	SUT	TET					
57	AMP	CLO	EST	NEO	SUL	TET					
58	AMP	CLO	NEO	SUL	SUT	TET					
59	CFC	CLO	NAL	NEO	SUL	TET					
60	CFC	EST	GEN	NAL	SUL	SUT					
61	CLO	EST	SUL	SUT	TET	TOB					
62	EST	GEN	NEO	SUL	TET	TOB					
63	AMC	AMP	CFC	NAL	SUL	SUT	TET				
64	AMP	EST	GEN	NEO	SUL	TET	TOB				
65	CFC	CLO	EST	NAL	SUL	TET	TOB				
66	CFC	CLO	NAL	NEO	SUL	SUT	TET				
67	AMC	CFC	EST	GEN	NAL	SUL	TET	TOB			
68	AMC	AMP	CFC	CLO	EST	SUL	SUT	TET			
69	AMP	CFC	CLO	EST	NAL	NEO	TET	TOB			
70	AMI	CFC	EST	GEN	NAL	NEO	SUL	TET	TOB		
71	AMI	AMP	CLO	EST	GEN	NEO	SUL	SUT	TET	TOB	
72	AMI	AMP	CLO	EST	GEN	NAL	NEO	SUL	SUT	TET	TOB

AMC= Amoxicilina+Ácido Clavulânico, AMI= Amicacina, AMP= Ampicilina, CFC= Cefactor, CIP= Ciprofloxacina, CLO= Cloranfenicol, EST= Estreptomina, GEN= Gentamicina, NAL= Ácido Nalidíxico, NEO= Neomicina, SUL= Sulfonamida, SUT= Clotrimoxazol, TET= Tetraciclina e TOB= Tobramicina.

Apêndice 2: Número de animais abatidos e número de animais positivos por coleta em cada localidade.

Coleta	Localidade	n de animais abatidos	N de animais positivos
1	A	3	1
1	B	5	1
1	C	4	1
1	D	4	2
2	E	4	3
2	F	4	0
2	G	4	4
2	H	4	1
3	I	1	1
3	J	4	3
3	K	5	5
3	L	6	2
4	M	2	1
4	N	5	1
4	B	4	1
4	O	5	3

Apêndice 3: Número de isolados, de cada sorovar, resistente a cada um dos 14 antimicrobianos testados.

Sorovar	n	AMC	AMI	AMP	CFC	CIP	CLO	EST	GEN	NAL	NEO	SUL	SUT	TET	TOB
Panama	33	-	1	6	4	1	1	17	7	15	12	30	6	4	4
Bredeney	18	-	3	6	6	-	7	7	3	9	6	14	4	6	4
<i>Salmonella</i> sp.	9	-	1	2	5	-	5	4	-	4	3	6	4	7	2
Typhimurium	9	1	1	-	2	1	3	1	1	7	-	6	5	8	2
Derby	6	-	1	2	1	-	-	4	-	2	3	5	2	6	-
Mbandaka	6	1	1	-	2	-	-	4	2	2	3	2	-	3	3
Minnesota	6	-	1	1	2	-	4	4	2	3	2	5	1	2	1
Ohio	2	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2	-	-	1	1
Orion	2	-	1	1	-	-	-	1	1	-	1	1	-	1	1
Agona	1	-	1	-	1	-	-	1	1	1	1	1	-	1	1

AMC= Amoxicilina+Ácido Clavulânico, AMI= Amicacina, AMP= Ampicilina, CFC= Cefactor, CIP= Ciprofloxacina, CLO= Cloranfenicol, EST= Estreptomicina, GEN= Gentamicina, NAL= Ácido Nalidíxico, NEO= Neomicina, SUL= Sulfonamida, SUT= Clotrimoxazol, TET= Tetraciclina e TOB= Tobramicina.

Apêndice 4: Número de isolados de cada sorovar com seus perfis.

Sorovar	N de isolados que apresentaram o Perfil	Código do Perfil
Agona	1	70
Bredeney	2	1
Bredeney	1	3
Bredeney	1	5
Bredeney	1	7
Bredeney	1	8
Bredeney	1	13
Bredeney	1	14
Bredeney	1	16
Bredeney	1	18
Bredeney	1	25
Bredeney	1	38
Bredeney	1	43
Bredeney	2	57
Bredeney	1	66
Bredeney	1	71
Bredeney	1	72
Derby	1	23
Derby	1	26
Derby	1	28
Derby	1	36
Derby	1	51
Derby	1	56
Mbandaka	1	1
Mbandaka	1	4
Mbandaka	1	6
Mbandaka	1	15
Mbandaka	1	24
Minnesota	1	33
Minnesota	1	42
Minnesota	1	45
Minnesota	1	48
Minnesota	1	50
Minnesota	1	59
Minnesota	1	67
Ohio	1	9
Ohio	1	22
Orion	1	1
Orion	1	64
Panama	5	1
Panama	1	5
Panama	1	10
Panama	1	12
Panama	2	19
Panama	1	20
Panama	1	21
Panama	1	27
Panama	5	29
Panama	1	30
Panama	1	32
Panama	2	34

Panama	1	35
Panama	1	39
Panama	1	40
Panama	1	41
Panama	1	44
Panama	1	49
Panama	1	54
Panama	2	55
Panama	1	60
Panama	1	62
Salmonella sp.	1	2
Salmonella sp.	1	4
Salmonella sp.	1	46
Salmonella sp.	1	58
Salmonella sp.	1	63
Salmonella sp.	2	65
Salmonella sp.	1	68
Salmonella sp.	1	69
Typhimurium	2	4
Typhimurium	1	11
Typhimurium	1	17
Typhimurium	1	29
Typhimurium	1	31
Typhimurium	1	52
Typhimurium	1	53
Typhimurium	1	61

Apêndice 5: Matriz de similaridade referente a Figura 10

Amostra	Medida de Proximidade (%)				
	14	15	22	23	215
14		100	67	29	29
15	100		67	29	29
22	67	67		50	25
23	29	29	50		67
215	29	29	25	67	

Apêndice 6: Matriz de similaridade referente a Figura 11.

Amostra	Medidas de Proximidade (%)				
	27	210	211	212	213
27		40	44	25	40
210	40		40	50	33
211	44	40		67	0
212	25	50	67		0
213	40	33	0	0	

Apêndice 7: Matriz de similaridade referente a Figura 12.

Amostra	Medidas de Proximidade (%)												
	14	15	16	17	21	25	212	213	216	217	219	220	221
14		83	83	91	44	25	80	73	80	80	80	80	73
15	83		100	91	67	25	80	91	80	80	80	80	73
16	83	100		91	67	25	80	91	80	80	80	80	73
17	91	91	91		50	29	89	80	89	89	89	89	80
21	44	67	67	50		40	57	75	57	57	57	57	50
25	25	25	25	29	40		33	29	33	33	33	33	29
212	80	80	80	89	57	33		89	100	100	100	75	89
213	73	91	91	80	75	29	89		89	89	89	67	80
216	80	80	80	89	57	33	100	89		100	100	75	89
217	80	80	80	89	57	33	100	89	100		100	75	89
219	80	80	80	89	57	33	100	89	100	100		75	89
220	80	80	80	89	57	33	75	67	75	75	75		67
221	73	73	73	80	80	29	89	80	89	89	89	67	

Apêndice 8: Matriz de similaridade referente a Figura 13.

Amostra	Medidas de Proximidade (%)							
	18	23	24	26	210	214	218	222
18		80	29	0	50	33	40	29
23	80		50	0	40	29	33	25
24	29	50		0	0	22	25	40
26	0	0	0		0	0	0	0
210	500	40	0	0		33	40	0
214	33	29	22	0	33		86	44
218	40	33	25	0	40	86		50
222	29	25	40	0	0	44	50	

Apêndice 9: Matriz de similaridade referente a Figura 14.

Amostra	Medidas de Proximidade (%)																		
	11	12	15	16	17	21	23	24	25	27	28	210	211	212	213	214	215	216	217
11						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0		67	86	86	67	75	67	100	67	86	86	40	57	75
23	0	0	0	0	0	67		80	80	83	55	67	67	44	60	80	25	40	73
24	0	0	0	0	0	86	80		75	80	67	57	86	57	75	100	33	50	89
25	0	0	0	0	0	86	60	75		60	67	57	86	57	75	75	33	50	67
27	0	0	0	0	0	67	83	80	60		73	67	67	44	60	80	25	40	73
28	0	0	0	0	0	75	55	67	67	73		50	75	50	67	67	29	44	60
210	0	0	0	0	0	67	67	57	57	67	50		67	33	57	57	40	29	50
211	0	0	0	0	0	100	67	86	86	67	75	67		67	86	86	40	57	75
212	0	0	0	0	0	67	44	57	57	44	50	33	67		86	57	40	57	50
213	0	0	0	0	0	86	60	75	75	60	67	57	86	86		75	33	50	67
214	0	0	0	0	0	86	80	100	75	80	67	57	86	57	75		33	50	89
215	0	0	0	0	0	40	25	33	33	25	29	40	40	40	33	33		67	29
216	0	0	0	0	0	57	40	50	50	40	44	29	57	57	50	50	67		67
217	0	0	0	0	0	75	73	89	67	73	60	50	75	50	67	89	29	67	

Apêndice 10: Matriz de similaridade referente a Figura 15.

Amostra	Medidas de Proximidade (%)			
	14	15	16	23
14		75	71	100
15	75		95	75
16	71	95		71
23	100	75	71	

Apêndice 11: Matriz de similaridade referente a Figura 16.

Amostra	Medidas de Proximidade (%)			
	24	25	26	27
24		75	75	89
25	75		50	67
26	75	50		67
27	89	67	67	

VITA

Roberta Macedo Bandeira, filha de Ieda Glaineci Macedo Bandeira e Ruperto Wascieleski Bandeira, nasceu em 12 de janeiro de 1973, natural de Pelotas, no Rio Grande do Sul.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas em 1996 na Universidade Federal de Pelotas. Do primeiro semestre de 1999 até o término do curso, no segundo semestre de 2000, fez estágio voluntário no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFPel. Neste período manteve atividades de pesquisa, monitoria e desenvolveu sua monografia. Colou grau em janeiro de 2001, como Bacharel em Ciências Biológicas.

Em março de 2001 ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.