



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO), REALIZADO
NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DE PERNAMBUCO
(LFDA/PE), RECIFE – PE, BRASIL

**FREQUÊNCIA DE *SALMONELLA* spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO, NO
PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE PATÓGENOS – PNCP/MAPA,
ANALISADAS NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA –
LFDA/PE**

ROBERTA ESTELITA DA SILVA CARVALHO

RECIFE, 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**FREQUÊNCIA DE *SALMONELLA* spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO, NO
PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE PATÓGENOS – PNCP/MAPA,
ANALISADAS NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA –
LFDA/PE**

Relatório de estágio supervisionado obrigatório realizado como encargo para obtenção do título de Bacharela em Medicina Veterinária, sob orientação da Prof^a Dr^a Maria Betânia de Queiroz Rolim e sob supervisão da Médica Veterinária e Auditor Fiscal Federal Agropecuário Katarina Mendonça Ribeiro.

ROBERTA ESTELITA DA SILVA CARVALHO

RECIFE, 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C331f Carvalho, Roberta Estelita da Silva
FREQUÊNCIA DE SALMONELLA spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO, NO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE PATÓGENOS – PNCP/MAPA, ANALISADAS NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA – LFDA/PE: RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO) / Roberta Estelita da Silva Carvalho. - 2022.
63 f. : il.
- Orientadora: Maria Betania de Queiroz Rolim.
Coorientadora: Katarina Mendonca Ribeiro.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Medicina Veterinária, Recife, 2022.
1. Inspeção Federal. 2. Frango. 3. Salmonella spp. I. Rolim, Maria Betania de Queiroz, orient. II. Ribeiro, Katarina Mendonca, coorient. III. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**FREQUÊNCIA DE *SALMONELLA* spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO, NO
PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE PATÓGENOS – PNCP/MAPA,
ANALISADAS NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA –
LFDA/PE**

Relatório elaborado por **ROBERTA ESTELITA DA SILVA CARVALHO**

Aprovado em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof.^ª. Dr.^ª. MARIA BETÂNIA DE QUEIROZ ROLIM

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UFRPE

Prof. Dr. JOSÉ DO EGITO DE PAIVA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA RURAL DA UFRPE

Med. Vet. e Auditor Fiscal Federal Agropecuário KATARINA MENDONÇA RIBEIRO

LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DE PERNAMBUCO

(LFDA/PE)

DEDICATÓRIA

Dedico a conclusão desse ciclo em minha vida à Deus pela oportunidade que Ele me concedeu em realizar meu sonho de concluir este curso. À minha mãe que com muita garra e força lutou para permitir que eu estudasse e chegasse até aqui. Ao meu esposo que sempre me apoiou em minhas conquistas. A minha filha por ser minha motivação diária para dar o meu melhor em tudo o que faço. E por fim, dedico esse trabalho aos meus irmãos e amigos por todo incentivo durante minha trajetória acadêmica. .

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela graça que recebi em poder realizar este sonho almejado desde criança. Por todo amor e misericórdia ao me conceder saúde, força, determinação e sabedoria de superar todos os obstáculos para conseguir concluir essa etapa da minha vida.

À minha mãe, Marlene Lima, meu primeiro grande amor, por todo esforço ao me incentivar a estudar, por lutar por mim e por meus irmãos durante toda nossa vida, por não permitir que nos faltasse nada mesmo tendo poucas condições financeiras. Esse mérito é todo seu mãe!! Tudo em minha vida é resultado do seu amor e dedicação infinita, te amo e com esse diploma honro todas as oportunidades que a vida lhe tirou.

Grata sou aos meus irmãos, Rafael Lima e Renata Silva, por me apoiarem em minha trajetória na busca por alcançar meus objetivos.

À meu esposo, amigo e companheiro de vida, Gustavo Carvalho, por todo amor e fé na minha capacidade de realizar minhas metas, por não duvidar um segundo se quer da minha força e determinação em concluir este ciclo e por me presentear com tanta cumplicidade e incentivo em não me deixar desistir e por me mostrar as promessas de Deus se realizando em minha vida.

Gratidão à minha filha, Celina Carvalho, por ser o raio de sol que me faz acordar todas as manhãs, por existir e trazer tanto amor numa fase tão importante para mim, por me fazer querer dar o meu melhor sempre. Que você possa se espelhar em tudo de bom que faço hoje filha, certamente farei de tudo que estiver ao meu alcance para te apoiar e incentivar na sua busca em realizar seus sonhos, te amarei infinitamente, sempre!

Agradeço aos meus familiares e amigos que torceram por mim e me ajudaram nesse percurso, tudo ficaria mais difícil sem as palavras de ânimo e coragem que muitos destinaram a mim em momentos decisivos.

À minha sogra Valdinete Carvalho, minha mãe e minha irmã por se dedicarem a cuidar da minha filha com tanto amor no período que precisei cumprir minha carga horária do ESO. Gratidão também as minhas amigas Clarissa Furtado e Daniele Simões por me darem tanto suporte emocional para conciliar maternidade e rotina fora de casa, no estágio.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, por se dedicar em fazer o

melhor por seus alunos, por me acolher e me permitir aprender tanto nestes anos que usufruí da academia. A todos os meus professores que com muito amor se empenham em ensinar o melhor, por me fazerem ter orgulho e a buscar sempre me tornar uma melhor profissional.

Aos meus colegas de turma que seguiram junto a mim na busca pela conclusão do curso, por me apoiarem nos momentos difíceis e dividirem comigo horas dedicadas aos estudos. Em especial, sou grata a minha amiga Maria Eduarda Cavalcanti, por sua preciosa amizade e por estar comigo na maior parte dos desafios que enfrentei, obrigada pelas horas compartilhadas de conversas, conselhos, estudos e boas risadas, pelos sonhos partilhados e pelo carinho de irmã que vivemos juntas.

Sou grata em especial aos Professores Dra. Rosilda Santos, Dra. Mércia Barros, Dr. Alessandro Jacinto e Dr. José do Egito por todos os conselhos e apoio na minha formação acadêmica, por segurarem minha mão e me ensinarem tanto, gratidão eterna por todas as oportunidades e por tanto carinho.

À professora e minha orientadora Dra. Maria Betânia Rolim por acreditar em meu potencial e me guiar pela trajetória do curso até o ESO, pela paciência na execução deste trabalho, pelo conhecimento compartilhado, obrigada por tanta dedicação e amor pelo que faz professora, a senhora é inspiração para minha vida!

À professora Dra. Andrea Paiva Moura e a Assistente em administração da PREG Alba Maria Belo por me orientarem no início do curso na busca de projetos de pesquisa que permitiriam minha permanência na graduação, por meio desses pude arcar com algumas despesas que certamente eu não conseguiria sem esse direcionamento.

Agradeço a todos que contribuíram para minha entrada e permanência durante o ESO no LFDA/PE, em especial ao Auditor Fiscal Federal Agropecuário e Chefe da Divisão Técnica Laboratorial Paulo Roberto David, pela oportunidade.

Gratidão também aos colegas da Microbiologia do LFDA/PE, por tantos ensinamentos e por me acolherem, em especial à minha supervisora do estágio a Auditor Fiscal Federal Agropecuário e Responsável Técnica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Dra. Katarina Mendonça Ribeiro, sou imensamente grata por todo seu apoio e compreensão em todos os momentos que precisei ao conciliar a maternidade com o período do estágio, sua generosidade e empatia são exemplos para mim, obrigada por tudo! E também ao colega Alessandro Araújo, por me guiar nas atividades dentro do laboratório e pelos conselhos na elaboração desde trabalho.

Por fim, gratidão a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a conclusão deste ciclo em minha vida!

EPIGRAFE

*“ Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e
juntamente entendam que a mão do Senhor fez isto,
... ”.*

***Bíblia Sagrada -
Isaiás 41:20***

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Fachada interna do LFDA/PE. B) Fachada do laboratório de microbiologia.....	22
Figura 2. A) Porta de acesso à área analítica B) Sala de Paramentação.....	23
Figura 3. A) Óculo de recebimento das amostras B) Amostra de frango recebida em embalagem com SIF.....	24
Figura 4. Fluxo laminar de pesagem das amostras.....	24
Figura 5. A) Banho Maria e micro-ondas B) Stomacher.....	25
Figura 6. A) Entrada da câmara fria B) Meios armazenados na câmara fria.....	26
Figura 7. Ultracongelador e refrigerador.....	26
Figura 8. Fluxo laminar com UV ligada.....	27
Figura 9. A) Estufa de secagem B) Liofilizador.....	28
Figura 10. Alíquota de amostra sendo transferida para tubo de ensaio.....	28
Figura 11. Bancada de leitura da Sala de análises especiais II.....	29
Figura 12. Placas para leitura de colônias na pesquisa de Salmonela.....	29
Figura 13. Fluxo laminar na pesquisa de E. coli.....	30
Figura 14. Estufas.....	30
Figura 15. Banhos-Maria laboratoriais.....	31
Figura 16. Placas envolvidas em papel laminado na estufa a 25°C.....	32
Figura 17. BIO-RAD®.....	33
Figura 18. MDS 3M®	33
Figura 19. VIDAS GREY®.....	34
Figura 20. VITEK 2 COMPACT®.....	34
Figura 21. Leitura de resultados de NMP.....	35
Figura 22. Local para lavagem de utensílios e preparo de soluções de limpeza.....	35
Figura 23. Autoclave de fronteira.....	36
Figura 24. Latões para esterilização em autoclave.....	36
Figura 25. Bacilos gram positivo de <i>Listeria monocytogenes</i>	38

Figura 26. Pesagem de amostra para detecção de <i>E. coli</i> STEC.....	39
Figura 27. Teste látex para uma amostra suspeita de <i>E. coli</i> STEC sorovar O26.....	40
Figura 28. Colônias para tipificação de <i>Salmonella</i> spp. em ágar estoque.....	41
Figura 29. A) Pesagem da alíquota para o processamento B) 25 gramas retirados da musculatura do frango.....	53
Figura 30. 25 gramas da carcaça em saco de pesagem que receberá 225mL de água peptonada tampão 1%.....	53
Figura 31. Alíquota de amostras incubadas em caldo RVS a 42°C.....	54
Figura 32. Esquema de distribuição dos caldos enriquecidos nos ágares seletivos.....	55
Figura 33. Confirmação automatizada por meio do VITEK 2 compact®.....	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Atividades desempenhadas no ESO e o tempo dedicado às atividades específicas.....	42
Quadro 2. Resultado obtido das análises de pesquisa de Salmonella spp nas carcaças de frango dentro do PNCP/MAPA no LFDA/PE.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-MU - 4-metil umbeliferona

4-MUP - 4-metil umbeliferil fosfato

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal

ALOA - Ágar Listeria de Ottaviani & Agosti

CGAL - Coordenação Geral de Laboratórios Agropecuários

CGAL - Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários

DIPOA - Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal

DTA - Doenças de transmissão alimentar

DTEC - Departamento de Serviços técnicos

DVA's - Doenças veiculadas por alimentos

EFSA - European Food Safety Authority

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay

ESO - Estágio Supervisionado Obrigatório

EUA - Estados Unidos da América

IN°20 - Instrução Normativa N ° 20, de 21 de Outubro de 2016

ISO - International Standard Organization

LEM - Laboratório de Esterilização e Produção de Meios

LFDA - Laboratório Federal de Defesa Agropecuária

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MKTTn - Tetrathionato – novobiocina de Muller – Kauffmann

MSRV - Rappaport – Vassiliadis Semissólido Modificado

NMP - Número Mais Provável

PACPOA - Programa de Avaliação de Conformidade de Produtos de Origem Animal Comestíveis

PCR - Polymerase Chain Reaction

PE - Pernambuco

PNCP - Programa Nacional de Controle de Patógenos

PNSA - Programa Nacional de Sanidade Avícola

RPM - Rotações Por Minuto

RVS - Caldo Rappaport – Vassiliadis Soja

SDA - Secretaria de Defesa Agropecuária

SIF - Serviços de Inspeção Federal

SOA - Solicitação Oficial de Análise

STEC - *Escherichia coli* produtora da toxina “Shiga-like”

TSA - Ágar Triptona de Soja

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

XLD - Ágar de Desoxicolato-Lisina-Xilose

RESUMO

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) é a disciplina obrigatória do décimo primeiro período do curso de bacharelado em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Por meio deste é possível aplicar os conhecimentos obtidos ao longo do curso na atuação prática da área profissional escolhida pelo aluno. Tem por base a vivência prática de 420 horas, em determinada subárea da medicina veterinária, cujo intuito é tornar o discente apto a exercer sua função, mediante aquisição do título de médico veterinário. Neste sentido, o presente relatório tem como objetivo principal demonstrar as atividades exercidas pelo discente no acompanhamento da rotina laboratorial correspondente aos programas de inspeção federal dos produtos de origem animal exigidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e executados pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA), vivenciando procedimentos como análises microbiológicas, acondicionamento das amostras em análise, avaliações quantitativas, emissão de laudos e no descarte e higienização de alguns materiais; sob orientação e supervisão, respectivamente, da docente Dr^a Maria Betânia de Queiroz Rolim e da Auditor Fiscal Federal Agropecuário e Responsável Técnica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do LFDA, Dra. Katarina Mendonça Ribeiro; e como objetivo secundário, pesquisar sobre a frequência de *Salmonella* spp. em carcaça de frango no Programa Nacional de Controle de Patógenos – PNCP/MAPA. O ESO ocorreu no período de 14 de fevereiro a 26 de maio de 2022, no setor de Microbiologia dos alimentos do LFDA/PE, sendo este um dos seis laboratórios credenciados à rede nacional vinculados à Secretaria de Defesa Agropecuária, por meio da Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários – CGAL/DTEC/SDA. O estágio permitiu adquirir conhecimentos de normas vigentes na inspeção federal dos produtos de origem animal, tanto para a finalidade de exportação quanto ao consumo no mercado interno, e também mensurou a frequência de um importante patógeno em carcaça de frango, a *Salmonella* spp., durante o período que ocorreu o estágio.

Palavras-chaves: Inspeção Federal, frango, *Salmonella* spp.

ABSTRACT

The Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) is the compulsory subject of the eleventh period of the bachelor's degree in Veterinary Medicine at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Through this it is possible to apply the knowledge obtained during the course in the practical performance of the professional area chosen by the student. It is based on the practical experience of 420 hours, in a certain sub-area of veterinary medicine, whose purpose is to make the student able to perform his/her function, by acquiring the title of veterinarian. In this sense, the main objective of this report is to demonstrate the activities carried out by the student in monitoring the laboratory routine corresponding to the Federal inspection programs of products of animal origin required by the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) and carried out by the Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA), experiencing procedures such as microbiological analyses, packaging of samples under analysis, quantitative evaluations, issuing reports and the disposal and cleaning of some materials, under the guidance and supervision, respectively, of Professor Dr. Maria Betânia de Queiroz Rolim and Federal Agricultural Tax Auditor and Technical Responsible of the Laboratório de Microbiologia dos Alimentos of the LFDA, Dr. Katarina Mendonça Ribeiro; and as a secondary objective, to investigate the prevalence of *Salmonella* spp. in chicken carcass in the Programa Nacional de Controle de Patógenos – PNCP/MAPA. The ESO took place from February 14 to May 26, 2022, in the Microbiologia dos Alimentos sector of the LFDA/PE, which is one of the six laboratories accredited to the national network linked to the Secretaria de Defesa Agropecuária, through the Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários – CGAL/DTEC/SDA. The internship made it possible to acquire knowledge of current norms in the federal inspection of products of animal origin, both for the purpose of export and for consumption in the domestic market, and also measured the prevalence of an important pathogen in chicken carcass during the period that the Internship.

Key words: Federal Inspection, chicken, *Salmonella* spp.

SUMÁRIO

I. CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)	21
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	21
2.1 ESTRUTURA INTERNA LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	22
2.1.1 SALA DE RECEPÇÃO E PESAGEM DE AMOSTRAS.....	23
2.1.2 SALA DE PROCESSAMENTO.....	25
2.1.3 SALA DE ANÁLISES ESPECIAIS I	26
2.1.4 SALA DE ANÁLISES ESPECIAIS II.....	28
2.1.5 SALA DE INCUBAÇÃO.....	30
2.1.6 SALA DE LEITURA E CONTINUIDADE I.....	32
2.1.7 SALA DE LEITURA E CONTINUIDADE II.....	34
2.1.8 ÁREA DE DESCARTE.....	36
3. ATIVIDADES REALIZADAS.....	37
I. DETECÇÃO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	37
II. DETECÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> STEC.....	38
III. ESTOQUE DAS COLÔNIAS POSITIVAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. PARA TIPIFICAÇÃO.....	40
IV. DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> SPP. E ANALISE DA FREQUÊNCIA EM CARÇA DE FRANGO NO LFDA/PE.....	41

4. DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES.....	42
II. CAPÍTULO 2 - FREQUÊNCIA DE SALMONELLA spp. EM CARCAÇA DE FRANGO NO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE PATÓGENOS – PNCP/MAPA ANALISADAS NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA – LFDA/PE.....	46
1. RESUMO.....	46
2. INTRODUÇÃO.....	46
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	48
3.1 <i>SALMONELLA</i> spp.....	48
3.2 SALMONELOSE.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 LOCAL.....	51
4.2 AMOSTRAGEM.....	52
4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO.....	52
I. PRÉ-ENRIQUECIMENTO EM MEIO LÍQUIDO SELETIVO.....	52
II. ENRIQUECIMENTO EM MEIO SELETIVO.....	53
III. EMPLACANDO EM MEIO SÓLIDO SELETIVO.....	55
IV. CONFIRMAÇÃO.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	58
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	61

I. CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)

1. INTRODUÇÃO

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) é a disciplina obrigatória do décimo primeiro período do curso de bacharelado em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sendo de cunho indispensável. Tem por base a vivência prática, de 420 horas, em determinada subárea da medicina veterinária, cujo enfoque é tornar o discente apto a exercer sua função, mediante aquisição do título de médico veterinário. Ao final do período, o discente deve dispor de relatório por ele elaborado no decorrer de suas atividades como estagiário, e apresentá-lo como documento exposto antes da defesa a ser realizada de forma expositiva para banca examinadora de sua escolha.

Sendo assim, o presente relatório tem como principal objetivo demonstrar as atividades exercidas durante o referido ESO pela discente Roberta Estelita da Silva Carvalho, sob orientação e supervisão, respectivamente, da docente Dr^a Maria Betânia de Queiroz Rolim e da Auditor Fiscal Federal Agropecuário e Responsável Técnica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do LFDA/PE, Dra. Katarina Mendonça Ribeiro, durante o período de 14 de fevereiro a 26 de maio de 2022, compreendendo seis horas diárias de segunda à sexta-feira, equivalentes a 30 horas semanais de atividades, totalizando 420 horas. Outro objetivo enfatizado neste trabalho de conclusão é pesquisar sobre a frequência de *Salmonella* spp. em carcaça de frango no Programa Nacional de Controle de Patógenos – PNCP/MAPA, recebidos e analisados pelo LFDA/PE, no período que ocorreu o ESO.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O ESO foi todo realizado no setor de Microbiologia do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco – LFDA/PE (Figura 1). A Instituição possui sua sede em Recife, no Bairro de Dois Irmãos, sendo responsável por análises microbiológicas de alimentos recebidos pelo Serviço de Inspeção Federal, atendendo a programas vigentes internacionais

para exportação de produtos de origem animal, como também aos programas nacionais para o controle de patógenos e monitoramento de insumos, bebidas e alimentos produzidos no Brasil. Anteriormente chamados de LANAGROs (Laboratórios Nacionais Agropecuários), os LFDAs são laboratórios vinculados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Existem seis laboratórios federais por todo país, presentes na região Sul em Porto Alegre/RS, na região Centro-Oeste em Goiânia/GO, na região Norte em Belém/PA, na região Nordeste em Recife/PE, e na região Sudeste em São Paulo e Minas Gerais (BRASIL, 2016).



Figura 1. A) Fachada interna do LFDA/PE. B) Fachada do laboratório de microbiologia.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

2.1 Estrutura Interna do Laboratório de Microbiologia

Toda área foi distribuída e planejada para que o fluxo de entrada, processamento e descarte de amostras respeitasse a eficiência da análise e também evitasse possíveis contaminações. Os espaços que compreendem o laboratório de microbiologia são Sala de Recepção e Pesagem de amostras, Sala de Armazenamento de Amostras Processadas e de Meios de Cultura, Sala de Processamento, Sala de Leitura e Continuidade I, Sala de Leitura e Continuidade II, Sala de Análises Especiais I, Sala de Análises Especiais II, Sala de Incubação e Sala de Lavagem e Descarte.

Há também o espaço anterior à entrada no espaço analítico, com mesas, armários e computadores, onde são realizados os serviços administrativos referentes ao laboratório como

compra de insumos, arquivamento de materiais, assinaturas e liberações de resultados, entre outros, e Sala de Paramentação.

2.1.1 Sala de Recepção e Pesagem de Amostras

O acesso à área analítica é feito previamente no espaço onde se armazenam batas, jalecos, pantufas, toucas e botas (Figura 2). Neste local o analista se prepara para acessar os espaços internos do laboratório, utilizando as vestes adequadas para a execução das análises. Também é onde se deposita para lavagem as batas, jalecos e botas sujas, e se descarta as pantufas e toucas usadas.

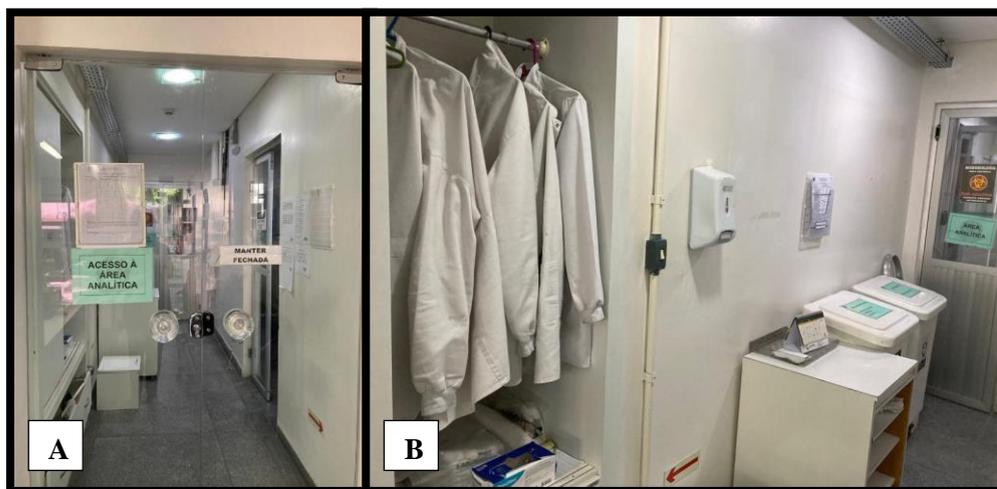


Figura 2. A) Porta de acesso à área analítica B) Sala de Paramentação.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Todo o processo de análise se inicia na sala de recepção e pesagem de amostras, no intuito de se evitar possíveis contaminações, da área externa ao interior do laboratório, se utiliza um óculo para entrada do material que será processado (Figura 3 A).

As amostras destinadas à análise microbiológica, são enviadas pelos fiscais federais, acompanhadas da SOA (Solicitação Oficial de Análise) com registro do SIF (Serviço de Inspeção Federal) do produto, quais ensaios serão realizados e as condições de armazenamento (Figura 3 B). O recebimento destas amostras é registrado em sistema. É impresso o formulário de dados brutos para acompanhamento da amostra e posterior registro e emissão dos resultados dos ensaios solicitados de acordo com as tabelas disponíveis no site do MAPA (<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/analises-laboratoriais->

anuarios-programas).



Figura 3. A) Óculo de recebimento das amostras B) Amostra de frango recebida em embalagem com SIF.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

As pesagens são realizadas em fluxo laminar, devidamente higienizado, com uso de utensílios como tesouras, pinças, espátulas e bisturis descartáveis, balança com checagem de desempenho previamente testada, bandejas e sacos de pesagem estéreis tipo *stomacher* (Figura 4). São pesados na maioria dos protocolos 25 gramas de cada amostra para seguir no processamento, com exceção do protocolo que pesquisa *Escherichia coli*, onde são pesadas 325 gramas do produto analisado.



Figura 4. Fluxo laminar de pesagem das amostras.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

2.1.2 Sala de Processamento

Após a pesagem as amostras seguem para a sala de processamento. Nesta área são dadas as continuidades de análise com os ensaios exigidos em cada protocolo. No espaço há fluxos laminares para plaqueamento de amostras e distribuição de diluições, banho maria e micro-ondas usados na fundição de ágar (Figura 5 A), *Stomacher* que possui a função de homogeneizar as amostras pesadas com seus respectivos caldos de diluição (Figura 5 B).

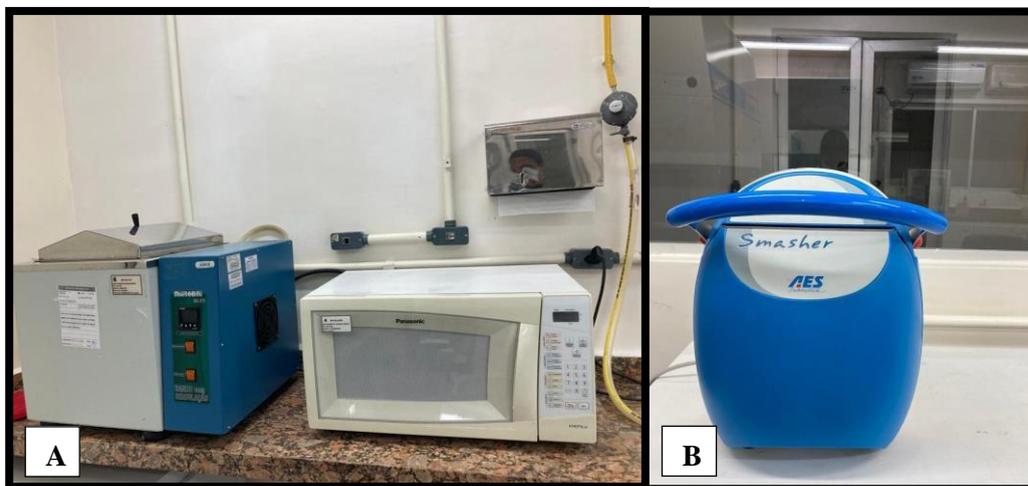


Figura 5. A) Banho maria e micro-ondas **B)** *Stomacher*.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Alguns exemplos de caldos usados no *stomacher* são: solução salina peptonada, caldo para diluição; água peptonada tamponada, usada como pré-enriquecimento não seletivo de *Salmonella*; e caldo Demi-Fraser (Half-Fraser), utilizado no enriquecimento seletivo de *Listeria*. Entre os meios de cultura usados na rotina laboratorial, podemos citar os ágaros: Saboraud, XLD, TSA (Ágar Triptono de Soja), Rambach, e ágar nutriente.

Os meios são preparados no setor de produção e esterilização de meios e materiais (LEM), pertencente ao LFDA, e são enviados ao laboratório de microbiologia, onde dão entrada na área de análise através do óculo da sala de pesagem e são armazenados numa câmara fria (Figura 6) localizada na Sala de Armazenamento de Amostras Processadas e de Meios de Cultura.

Dentro da câmara fria, meios líquidos e sólidos são organizados em prateleiras identificadas para se visualizar melhor a quantidade de insumos disponíveis nos ensaios de cada semana. A entrada e saída de pessoas na câmara, é controlada, evitando deixar a porta por muito tempo aberta, no intuito de impedir trocas de temperaturas com o meio externo e comprometer a

conservação dos meios.



Figura 6. A) Entrada da câmara fria B) Meios armazenados na câmara fria.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

2.1.3 Sala de Análises Especiais I

Nesta sala é feita a conservação e manutenção de cepas de referência. Para se manter os microrganismos viáveis por longo período de tempo se armazena as cepas em um ultracongelador a 80°C negativos e como apoio para se refrigerar as culturas de referências se usa um refrigerador (Figura 7).



Figura 7. Ultracongelador e refrigerador.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Microorganismos com gênero e espécie identificados, catalogados e caracterizados de acordo com as culturas padrões nacionais e internacionais são usados como cepas de referência para o processamento das análises. Geralmente são obtidas de uma coleção reconhecida onde é possível rastrear sua origem.

Na rotina laboratorial se faz a incubação de bactérias, fungos e leveduras de referência, posteriormente se realiza repiques destas culturas para serem usados nas análises, semanalmente. Tanto a distribuição de meios inócuos quanto as incubações e repiques das cepas de referências são feitas no fluxo laminar (Figura 8) localizado nesta sala.



Figura 8. Fluxo laminar com UV ligada.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

A sala também é equipada com uma estufa de secagem a 45°C (Figura 9 A). Após fundir-se e distribuir os meios sólidos em placas, se armazena em refrigeração para usos futuros. Ao se retirar tais placas do refrigerador é necessário secá-las evitando a condensação e dificultando o estriamento dos caldos.

Nesta área também se localiza um liofilizador laboratorial (Figura 9 B). Nele é possível realizar o processo de sublimação da cultura, onde se passa sem descongelamento, a amostra do estado sólido para o estado gasoso. As amostras são congeladas à seco sob vácuo. Atualmente este equipamento não é rotineiramente usado, porém está à disposição.

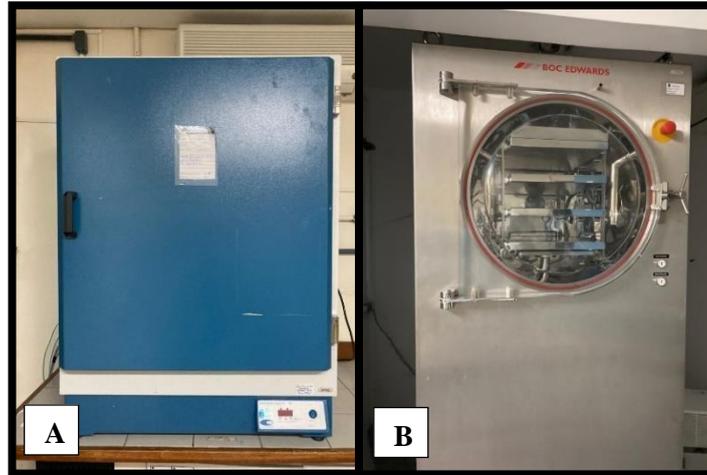


Figura 9. A) Estufa de secagem B) Liofilizador.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

2.1.4 Sala de Análises Especiais II

Neste espaço é realizada a preparação das amostras após a incubação inicial em caldo. Desta forma alíquotas são transferidas de potes para tubos de ensaios próximo ao Bico de Bunsen (Figura 10), seguindo à execução dos processos solicitados nas metodologias de cada pesquisa por microrganismos. Assim, a sequência dos ensaios que é feita por outros equipamentos, é preparada e destinada à Sala de Leitura e Continuidade I.



Figura 10. Alíquota de amostra sendo transferida para tubo de ensaio.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Para dar o suporte necessário nessas análises, há dois refrigeradores de armazenamento de insumos e amostras, com kits e meios utilizados nos equipamentos de triagem e nos testes

confirmatórios. Há também uma bancada de leitura com um contador de colônias e blocos de aquecimento para etapa de lise do PCR (Figura 11).



Figura 11. Bancada de leitura da Sala de Análises Especiais II.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

As leituras de placas e caracterização de colônias típicas de Salmonela (Figura 12), *E. coli* e Listeria são feitas nesta sala. Amostras para pesquisa de Salmonela são incubadas em placas com ágar XLD (Ágar de Desoxicolato-Lisina-Xilose) e ágar Rambach. Para Listeria se usa os ágar ALOA (Ágar Listeria de Ottaviani & Agosti) e PALCAM. E para *E.coli* o ágar Rainbow.



Figura 12. Placas para leitura de colônias na pesquisa de Salmonela.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Outro equipamento existente na sala é o fluxo laminar, utilizado para o preparo de soluções de PCR nas análises de *E.coli* (Figura 13). Devido ao uso com kits sensíveis a contaminações genéticas, essa cabine é exclusiva para essa finalidade no intuito de se evitar contaminações que possam comprometer o resultado final da reação.



Figura 13. Fluxo laminar na pesquisa de E. coli.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

2.1.5 Sala de Incubação

É composta por seis estufas (Figura 14) e dois Banhos-maria laboratoriais (Figura 15). Na rotina, as estufas são usadas na incubação de fungos e bactérias, tanto em potes após a diluição em caldos na continuidade da pesagem, quanto em placas e tubos de ensaio.



Figura 14. Estufas.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).



Figura 15. Banhos-maria laboratoriais.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

As temperaturas das estufas foram definidas de acordo com as exigências de temperatura ótima de cada microrganismo analisado na rotina laboratorial, assim há estufas de 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 42°C e 44°C. Todas as temperaturas são conferidas diariamente para se ter um controle eficiente que impeça as variações térmicas. O Banho-maria a 45°C é usado na metodologia de número mais prováveis e contagem de coliformes termotolerantes a 45°C. E o Banho-maria a 42°C é usado na metodologia de *Salmonella* spp.

Na estufa a 25°C é incubado os ensaios para bolores e leveduras, as placas usadas para cultivo de fungos são envolvidas em papel laminado (Figura 16) para evitar contaminação do equipamento e das demais amostras. Em 30°C se usa nas metodologias de contagem presumtiva de *Bacillus cereus*, contagem de coliformes totais, números mais prováveis de coliformes totais, detecção de *Listeria monocytogenes*, contagem de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis a 30°C e logo após a pré-incubação a 35°C por 7 dias.

Para a estufa a 35°C são destinados os ensaios de confirmações em detecções de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e *E. coli* verotoxigenica não O157:H7. Essa estufa também é usada na metodologia de número mais provável e contagem de coliformes termotolerantes a 45°C. A 37°C se usa nas metodologias de contagem de *Staphylococcus aureus*, número mais provável de *Staphylococcus* coagulase positiva, detecção de *Salmonella* spp., detecção de *Listeria monocytogenes*, detecção de *Staphylococcus aureus* e contagem total de *Enterobacteriaceae*.



Figura 16. Placas envolvidas em papel laminado na estufa a 25°C.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Na estufa a 42°C são feitos os ensaios de triagens das metodologias de detecções de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e *E. coli* verotoxigenica não O157:H7. E na estufa a 44°C se faz o ensaio para contagem total de *E. coli*.

2.1.6 Sala de Leitura e Continuidade I

Nesta sala ocorrem as triagens e confirmações dos ensaios automatizados. Os equipamentos presentes neste espaço são BIO-RAD®, MDS 3M®, VITEK 2 compact® e VIDAS GREY®. O BIO-RAD® (Figura 17) é um PCR em tempo real onde é feito a triagem dos ensaios de *E. coli* STEC O157:H7 e não O157:H7 (sorovares O26, O45, O103, O111, O121 e O145) e confirmação desses microrganismos viáveis nesta mesma metodologia.

O MDS 3M® (Figura 18) é um instrumento com rápida detecção molecular de patógenos em alimentos enriquecidos, através do uso de amplificação isotemal e bioluminescência, é destinado às amostras que foram submetidas ao tratamento térmico durante a etapa de lise de ensaio, com o intuito de destruir a parede celular para exposição do material genético. Na rotina laboratorial é usado para realizar a triagem das amostras na pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

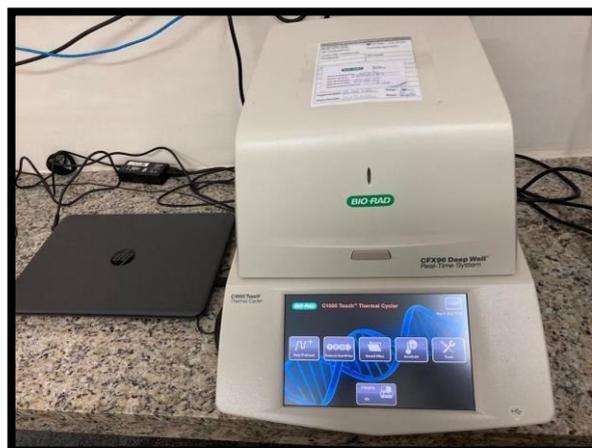


Figura 17. BIO-RAD®.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

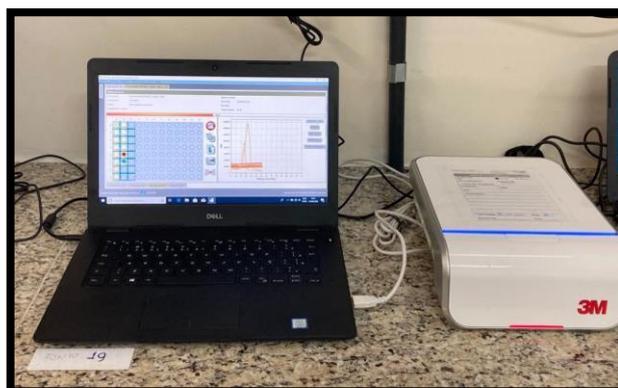


Figura 18. MDS 3M®.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

VIDAS GREY® (Vitek Immuno Diagnostic Assay System) (Figura 19) é um sistema multiparamétrico de imunodiagnóstico. A técnica utilizada é o método ELISA com uma leitura final em fluorescência: técnica ELFA (ELFA = Enzyme Linked Fluorescent Assay). A enzima atuante nesse sistema é a fosfatase alcalina. O substrato é o 4-metil umbeliferil fosfato (4-MUP) que é hidrolisado em 4-metil umbeliferona (4-MU). A umbeliferona tem a propriedade de reemitir a luz a 450 nm após excitação a 370 nm. O equipamento oferece lotes de rotina ou testes de acesso aleatório para sorologia, imunohistoquímica, detecção de antígeno e imunohemostase. Cinco seções de análises independentes permitem realizar 30 testes simultaneamente. Na rotina do laboratório é usado para realizar a triagem de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*.



Figura 19. VIDAS GREY®.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

O VITEK 2 compact® (Figura 20) é utilizado na rotina como teste para confirmação nas metodologias de pesquisa em *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Funciona realizando 64 tipos de análises bioquímicas simultâneas, o que permite um resultado de maior precisão na identificação microbiológica. Após o isolamento em placas, as colônias mais características seguem para este equipamento, onde um cassete é carregado pelo próprio sistema com essas amostras, evitando ao máximo o manuseio e uma possível contaminação. A incubação e a leitura são gerenciadas pelo sistema operacional, com a identificação feita pelo analista do ensaio.



Figura 20. VITEK 2 compact®.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

2.1.7 Sala de Leitura e Continuidade II

Nesta sala são realizadas as leituras dos ensaios quantitativos, confirmações e

isolamentos. Dentre as atividades estão leituras de placas enterobactérias, coliformes totais e termotolerantes, como também contagem de microrganismos como bolores, leveduras e *E. coli* β -Glucuronidase positiva (Figura 21).

Neste espaço há mais duas áreas para análises com bancada e bico de Bunsen, e uma pia (Figura 22) para lavagem de utensílios reutilizáveis que posteriormente serão autoclavados, preparo de soluções de limpeza e desinfecção usados na rotina, como hipoclorito de sódio e ácido peracético, e também armários para guardar estantes, potes de descarte, sacos esterilizáveis, entre outros materiais de usos laboratoriais.



Figura 21. Leitura de resultados de NMP.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).



Figura 22. Local para lavagem de utensílios e preparo de soluções de limpeza.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

2.1.8 Área de Descarte

No final do corredor de acesso às Salas de Leitura e Continuidade I e Sala de Leitura e Continuidade II há um espaço onde fica a autoclave de fronteira (Figura 23) para descontaminação de todos os materiais e resíduos, reutilizáveis e descartáveis, que foram usados em ensaios onde entraram em contato com microrganismos.



Figura 23. Autoclave de fronteira.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Em todas as salas existem lixeiros para lixo comum e lixo infectante, diariamente ou a depender da demanda de recolhimento, antes de ser descartado, o lixo contaminado é autoclavado dentro de sacos autoclaváveis e acondicionados em latões (Figura 24) específicos para altas temperaturas. O lixo comum é descartado sem passar pelo tratamento térmico.



Figura 24. Latões para esterilização em autoclave.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Os descartes são classificados em: descarte não contaminado, como embalagens, caixas e papéis; material perfuro cortante como bisturis, agulhas e vidros quebrados; material contaminado para autoclavação e reutilização, como vidrarias da rotina laboratorial que é destinada ao LEM; material contaminado para autoclavar e descartar, como alças e tubos descartáveis.

3. ATIVIDADES REALIZADAS

Durante o ESO, foram realizados acompanhamentos da rotina laboratorial nos ensaios:

I. Detecção de *Listeria monocytogenes*;

Tem por objetivo monitorar e assegurar que produtos de origem animal prontos para o consumo estejam inócuos para este patógeno. Na metodologia para a detecção, inicialmente são pesadas 25 g de amostra e homogeneizadas em 225mL de caldo Demi-fraser, em seguida se incuba a 37°C por 24h. Após esse período, são pipetados 100uL para 10mL de caldo Fraser e incubados a 37°C por 24h.

É realizado a PCR com 20uL da amostra em um tubo já pronto para lise, comercializado em kit específico. Essa mistura é aquecida a 95°C num bloco e após 15 min, posteriormente vai para um outro bloco a temperatura ambiente por pelo menos 5 min. Após isso é retirada uma alíquota de 20uL para um tubo com primer e passa por análise no MDS 3M® por 75 min.

A amostra positiva é estriada em ALOA e PALCAM a 38°C por 24-48h. Ágar ALOA é um meio de cultura cromogênico, seletivo e diferencial usado para o isolamento de *Listeria monocytogenes* e outras *Listeria* spp. Ocorrendo a presença do microrganismo, a colônia apresenta coloração verde-azulada. Já em ágar PALCAM, as colônias apresentam crescimento razoável a excelente, com coloração cinzenta-esverdeada circundadas por halos castanhos-escuros a pretos no meio.

As Colônias típicas, que surgem no ágar ALOA e PALCAM são estriadas em ágar sangue e incubada a 37°C por 24h. Após esse período é verificado se a colônia estriada apresenta beta Hemólise, sendo positivo é realizado um teste bioquímico com os caldos Xilose e Ramnose e incubados a 37°C. É feito também teste de catalase com peróxido de hidrogênio e coloração de GRAM para verificar se a amostra é cocos ou cocobacilos Gram-positivos.

A coloração de Gram permite que as bactérias retenham a cor com base nas diferenças químicas e físicas de sua parede celular. Utilizando as etapas por coloração com violeta de cristal (um corante solúvel em água, roxo), a descoloração (utilizando etanol / acetona) e contra-coloração (utilizando corante Safranina, vermelho) é possível entender o princípio de diferentes graus de permeabilidade na parede celular dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

As bactérias Gram-positivas retêm o cristal violeta por causa da presença de uma espessa camada de peptidoglicano em suas paredes celulares, apresentando-se na cor roxa, como é possível observar nas colônias de Bacilos Gram-positivo de *Listeria monocytogenes* (Figura 25).

Já as bactérias Gram-negativas possuem uma parede de peptidoglicano mais fina, que não retém o cristal violeta durante o processo de descoloração e recebem a cor vermelha no processo de coloração final.

Se em todos esses testes, os resultados forem positivos a amostra terá Presença em 25g para *Listeria monocytogenes*. Se em algum deles der negativo, com exceção da catalase, o resultado é Ausência em 25g.



Figura 25. Bacilos Gram-positivo de *Listeria monocytogenes*.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

II. Detecção de *Escherichia coli* STEC;

Com o objetivo de realizar o controle microbiológico das carcaças de suínos e carcaça e carne bovinas em abatedouros frigoríficos, como também de avaliar a higiene do processo de produção e reduzir a prevalência deste patógeno, a metodologia laboratorial se inicia com a pesagem de $325 \pm 32,5$ g da amostra (Figura 26), em seguida é homogeneizada com 975 mL de

caldo TSB modificado (com caseína) e incubada a 42°C por 18±3h.

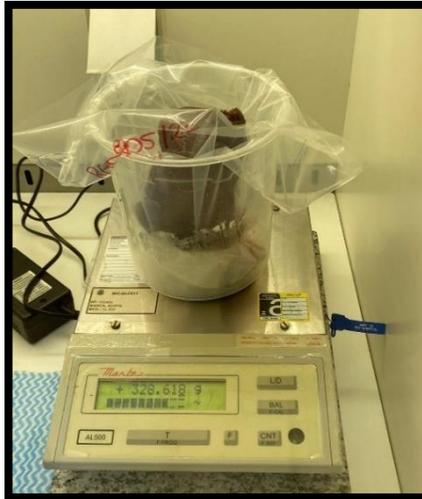


Figura 26. Pesagem de amostra para detecção de *E. coli* STEC.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Após esse período, retira-se do caldo incubado uma alíquota de aproximadamente 10 mL, onde será a partir desse volume que se realizarão todas as análises seguintes. Alíquotas são direcionadas para o BIO-RAD®, em que se adiciona 100µ de solução de lise com 100µ da alíquota do caldo incubado em uma rack deepwell e aquece a 100°C sob agitação de 1.300 RPM (Rotações Por Minuto) por 20 min. Em seguida, se resfria por pelo menos 5 min a 5°C, e se adiciona 5µ da amostra lisada em 20µ da solução de PCR (primer).

No equipamento, a amostra passa por 50 ciclos de reações polimerase. As amostras que têm resultado positivo precisam repetir a leitura em outro kit específico que dirá qual dos tipos sorotípicos a amostra é positiva de forma presuntiva. Para a confirmação é feita a filtração magnética referente a cada sorotipo detectado presumidamente na triagem. Após a filtração, a amostra é diluída em 1:10 e 1:100 e paralelamente é feito um tratamento ácido por 1 h e depois diluída 1:10. Essas quatro diluições são plaqueadas em ágar Rainbow e incubadas a 35°C por 24h.

Após essas etapas, é feita a leitura das placas incubadas e são selecionadas até 5 colônias com morfologias distintas para realizar um teste de sorologia por látex específico para o microrganismo em pesquisa (Figura 27), se no teste houver formação de grumos, significa que a colônia é positiva. Sendo positiva, a colônia é estriada em ágar sangue de carneiro ou ágar TSA com 5% de sangue de carneiro e incubado a 35°C por 24h.

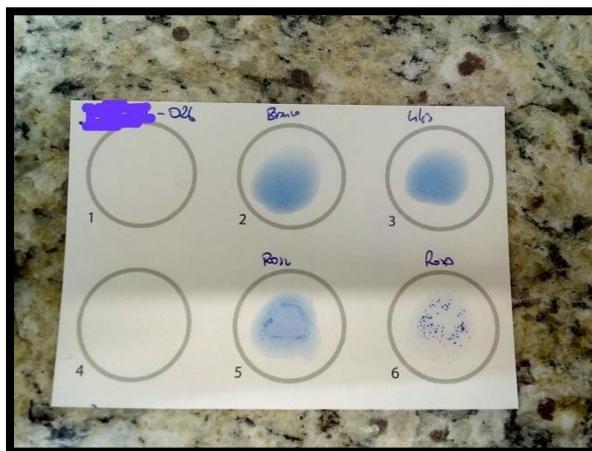


Figura 27. Teste látex para uma amostra suspeita de *E. coli* STEC sorovar O26.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Na sequência é repetido o teste do látex, se a colônia for positiva, então é realizado o PCR para confirmar se é STEC, também é realizado um ensaio bioquímico automatizado no VITEK 2 compact® para confirmação de *E. coli*. Com todos os resultados positivos a amostra recebe o resultado de Presença em 325g. Se qualquer um deles der negativo, a amostra recebe o resultado de Ausência em 325g.

III. Estoque das colônias positivas de *Salmonella* spp. para tipificação.

Na Instrução Normativa N° 20, de 21 de outubro de 2016 (IN°20) do MAPA, as colônias positivas para *Salmonella* spp. provenientes da cadeia produtiva de peru e frango de corte, devem participar do estudo epidemiológico de prevalência dos sorovares circulantes no Brasil. Os laboratórios cadastrados pelo MAPA para realizar tais análises, devem alimentar um banco de dados para que a Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) possa, com base nessas informações, monitorar e realizar ações de controle desse patógeno.

Caso o laboratório identifique amostras positivas para *Salmonellas* monofásicas, cujas fórmulas antigênicas sejam *Salmonella* (1,4[5],12:-:1,2) ou *Salmonella* (1,4[5],12:i:-), como também para *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* deve se realizar uma notificação compulsória ao DIPOA, com o intuito de realizar o controle eficaz desses patógenos de grande relevância à saúde

pública (BRASIL, 2022).

Na rotina laboratorial, as colônias positivas são destinadas ao LFDA em São Paulo para a tipificação, sendo transferidas do ágar nutriente, após a confirmação, para o ágar estoque inclinado (Figura 28) e incubadas a 37 graus por 24 horas, após esse período são armazenadas em caixa específica para o envio.



Figura 28. Colônias para tipificação de *Salmonella* spp. em ágar estoque.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

IV. Detecção de *Salmonella* spp. e análise da frequência em carcaça de frango no LFDA/PE.

A *Salmonella* é considerada um dos principais patógenos envolvidos nas infecções alimentares, seu controle e monitoramento pelos Órgãos Oficiais são fundamentais para garantir a segurança dos alimentos na saúde pública, como também é considerado um microrganismo de referência para pesquisa por contaminação de produtos de origem animal. As ações de controle envolvem toda a cadeia produtiva de frangos e perus, desde a matéria prima até o produto final submetido ao processo industrial, seguindo tanto em estabelecimentos comerciais quanto em abatedouros, incluindo ainda o controle em carnes bovina e suína.

A presença de *Salmonella* na carne suína e bovina está ligada à contaminação fecal e cruzada durante o processamento industrial, como também na temperatura de conservação desses produtos durante a produção industrial, fazendo-se necessário um controle sanitário eficaz no intuito de não haver perdas econômicas nos produtos de exportação. A detecção laboratorial da *Salmonella* spp. se faz por meio da metodologia *International Standard Organization (ISO) 6579-1/2017*. Tanto a detecção quanto a análise de frequência da salmonela em carcaça de frango nas

amostras destinadas ao LFDA/PE serão melhor detalhadas no Capítulo 2 deste relatório.

Em todas as análises são usados controle positivo e amostra branca, para se comprovar a eficácia dos meios e metodologias aplicadas a cada ensaio, identificando possíveis falhas e permitindo tempo hábil de correção durante o prazo de pesquisa e liberação dos resultados. O quadro a seguir demonstra o tempo dedicado às atividades realizadas.

Quadro 1. Atividades desempenhadas no ESO e o tempo dedicado às atividades específicas.



Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

4. DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES

A descrição das atividades desenvolvidas no ESO ratifica a importância de se pesquisar alguns dos principais patógenos alimentares presentes nos produtos de origem animal. As detecções de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* fazem parte do PNCP, um dos programas de controle oficial de produtos de origem animal do MAPA. Visa identificar a prevalência destes patógenos em produtos produzidos nos estabelecimentos brasileiros registrados ao SIF (BRASIL, 2017).

Segundo Rocourt (2000) a listeriose tem relevância na saúde pública por ter alta taxa de mortalidade, próximo a 50%. É uma bactéria de ampla disseminação, capaz de sobreviver em condições adversas por longos períodos e se multiplicar sob temperatura de refrigeração, *L. monocytogenes* pode contaminar superfícies e utensílios de contato com a produção de alimentos na indústria, sendo assim, um patógeno importante na transmissão de Doenças veiculadas por alimentos (DVA's) em todo o mundo (GANDHI e CHIKINDAS, 2007). Por isso,

é tão relevante incluir este microrganismo nas análises de alimentos na inspeção federal, tanto para se garantir a segurança dos alimentos no Brasil, quanto para se exportar alimentos livres de patógenos e garantir a permanência de produtos brasileiros no mercado internacional.

Vários surtos já foram relatados em diversos países, onde no homem, a principal via de transmissão é através dos alimentos de origem animal, como também de origem vegetal. Uma grande variedade de alimentos já apresentou relação com a infecção por *Listeria*. (MCLAUHLIN,1996). Outra característica importante é a capacidade de formar biofilme, aumentando o risco de contaminação cruzada de outros tipos de alimentos produzidos ou conservados juntos, tanto crus quanto prontos para o consumo (SERGELIDIS et al., 1997).

Biofilme é a capacidade de um microrganismo aderir a uma superfície através de uma matriz polissacarídica, podendo estar em diferentes locais dentro da indústria, como nos encanamentos de água, superfícies de processamentos, áreas de estocagem, entre outras. Tal capacidade permite a transferência de células bacterianas para os alimentos, sendo então algo necessário de se evitar na indústria de alimentos (GANDHI et al., 2007).

Gasanov et al. (2005), afirmam que os métodos de diagnóstico tradicionais de isolamento de *L. monocytogenes*, aprovados por agências regulamentadoras, exigem muitos dias para serem concluídos, pois necessitam de enriquecimento seletivo, plaqueamento em meios seletivos e confirmação bioquímica dos isolados. Da mesma maneira como são realizados os ensaios para detecção deste patógeno nos LFDAs. O uso de técnicas moleculares como o PCR também auxilia no diagnóstico mais preciso, fazendo uma pré-seleção de amostras positivas e limitando a quantidade de insumos utilizados nas análises para confirmação pelos demais testes, assim como também é feito nos laboratórios federais.

Segundo Silva et al (1998), na coloração de Gram, as características observadas para *Listeria* são bastonetes curtos, Gram-positivos, isolados ou em cadeias, assim como se apresentam as colônias consideradas positivas nas análises laboratoriais. Os produtos coletados nos estabelecimentos, de preferências os que são comercializados fatiados, de acordo com a normativa para pesquisa de *Listeria* são: PRODUTOS CÁRNEOS - (presunto cozido, presunto defumado, apresuntado, mortadela, fiambre, lanche), salsicha, salsichão, lombo cozido, lombo defumado, paleta cozida e paleta defumada; PRODUTOS LÁCTEOS - queijo minas frescal, ricota (fresca, defumada), queijo coalho, queijo de manteiga, queijo muçarela, queijo prato, queijo minas padrão, queijo tropical, queijo minas meia cura, queijo colonial, queijo cottage e queijo ralado; PESCADO - filé de salmão defumado e peixe defumado, bastonetes de surimi congelados, produtos à base de surimi congelados, camarão cozido congelado, molusco bivalve

cozido congelado (BRASIL, 2022).

Escherichia coli constitui uma espécie de bactérias que habitam a microbiota intestinal do homem e de muitos animais, não apresentando risco a saúde. (FENG, 2011). Porém, subgrupos de *E. coli* apresentam fatores de virulência que os tornam capazes de causar doenças. As produtoras de toxinas Shiga (STEC) formam um grupo de bactérias patogênicas envolvidas em surtos de DTA's, ao qual *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) constitui um subtipo (CALDORIN, 2013).

Segundo Lucatelli (2012), as STEC são importantes agentes patogênicos, pois estão relacionadas com a ingestão de alimentos contaminados. Podem provocar desde uma diarreia leve até severas diarreias sanguinolentas que podem evoluir para complicações extra intestinais graves como a Síndrome Hemolítica Urêmica, com a falência renal e a Púrpura Trombocitopênica como possível sequelas. Dessa maneira, para se evitar um surto de doenças alimentares, se justifica a importância da pesquisa desse microrganismo a nível nacional, dos alimentos de origem animal produzidos.

Desde 2015 que se incluiu na pesquisa os sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121 e O145, também conhecidos como “*big six*”, os quais foram associados em surtos por meio do consumo de carne malpassada bovina em diversos países (DESORDI, 2020). Dessa forma, na rotina laboratorial do LFDA, é feito o teste de látex para identificar os sorovares, e confirmar posteriormente as colônias positivas através do PCR, onde a identificação é feita baseada na presença de genes de virulência como a produção de toxina Shiga. As amostras coletadas para análise, são provenientes da carcaça de suínos, por correr o risco de contaminação cruzada durante a produção na indústria, e principalmente da carcaça e carne bovina, uma vez que o trato gastrointestinal dessa espécie é o principal reservatório de *E. coli* STEC (NATARO, 1998).

A carne pode ser contaminada tanto por falha no abate correto, onde as fezes do animal entram em contato com a musculatura, quanto por utensílios e superfícies mal higienizados que entram em contato com as fezes contaminadas e posteriormente com a carne no beneficiamento da indústria, o que caracteriza a contaminação cruzada (PAIM, 2016).

As metodologias atuais para detecção de *E. coli* O157:H7 exigem etapas de enriquecimento inicial para que ocorra a recuperação do microrganismos, e assim possa se multiplicar até alcançar uma concentração mínima para a detecção. Em seguida, é a etapa de isolamento a partir de meios seletivos, com base nas características fenotípicas. (ADAMS, 2008).

De forma semelhante, o LFDA segue tais etapas, porém, para se usar insumos de maneira eficaz, e reduzir o tempo na entrega do resultado final, é feito inicialmente um PCR de triagem através do equipamento BIO-RAD®, a partir do caldo de enriquecimento, onde as amostras positivas seguirão para as demais análises presuntivas, outro PCR no mesmo equipamento para confirmação é realizado no final de toda pesquisa, como também no equipamento VITEK 2 compact®, que realiza os testes bioquímicos com precisão em pouco tempo. Franz et al. (2014) enfatizam a necessidade de melhorar os métodos de detecção de cepas altamente patogênicas, como a STEC, com o objetivo de agir de forma mais eficiente ao longo da cadeia de produção de alimentos.

Assim como ocorre na metodologia de análise no LFDA, a separação imunomagnética é usada para reduzir o tempo de análise e aumentar a sensibilidade da detecção, tanto na rotina laboratorial quanto em pesquisas acadêmicas na detecção de *E. coli* O157:H7, é mencionada como uma técnica que utiliza partículas superparamagnéticas revestidas com anticorpos contra o agente patogênico alvo, formando esferas imunomagnéticas que podem se ligar às bactérias alvo.(PAULA et al. 2014).

De acordo com a IN°20, as culturas positivas de *Salmonella spp.* isoladas de amostras oficiais deverão ser encaminhadas ao laboratório responsável pela identificação do sorovar, quando forem identificados os sorovares *Salmonella* Typhimurium ou *Salmonella* Enteritidis o laboratório responsável notificará imediatamente ao SIF correspondente e posteriormente encaminhará o relatório previsto na normativa (BRASIL, 2016). Assim, na rotina laboratorial, as amostras positivas do LFDA/PE, seguem para tipificação no LFDA/SP.

II. CAPÍTULO 2 - FREQUÊNCIA DE *SALMONELLA* spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO, NO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE PATÓGENOS – PNCP/MAPA, ANALISADAS NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA – LFDA/PE

1. RESUMO

É de responsabilidade do poder público garantir alimentos seguros, livres de patógenos e de substâncias que possam comprometer a saúde da população. Diante disso, o MAPA vem estabelecendo diretrizes que permeiam a cadeia produtiva, permitindo que os produtos de origem animal sejam produzidos e comercializados, próprios para o consumo. Dentro dessa cadeia, a carne de frango é uma importante proteína que exige fiscalização por todas as suas etapas de produção para se evitar contaminações. A *Salmonella* é uma bactéria que pode estar presente na carcaça de frango e provocar infecção alimentar severa na população. O presente trabalho tem como objetivo apontar a frequência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos, que pertencem ao PNCP/MAPA, analisadas no período de 14 de fevereiro a 26 de maio de 2022, pelo setor de Microbiologia dos alimentos do LFDA/PE. A metodologia para o isolamento e identificação de *Salmonella* spp. é composta por quatro estágios sucessivos: pré-enriquecimento em meio líquido seletivo; enriquecimento em meio seletivo; emplacando em meio sólido seletivo; e confirmação por ensaios automatizados e testes de sorologia. Ao total foram 52 carcaças analisadas durante as 15 semanas de atividades. Os resultados mostraram uma frequência de 9,6% amostras com presença de *Salmonella* spp. Podemos concluir, a partir do resultado, a importância de fiscalizar e analisar amostras de estabelecimentos registrados no SIF, no intuito de evitar que ocorra surtos de doenças veiculadas por alimentos (DVAs) provocadas por patógenos que prejudicam a saúde pública, a exemplo como a *Salmonella*.

2. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, o Brasil vem implementando políticas públicas para o desenvolvimento do agronegócio. O MAPA foi instituído para atender ao mercado consumidor interno e externo, promovendo a segurança dos alimentos. Em paralelo, utiliza-se de uma estrutura

organizacional voltada à formulação de leis e diretrizes que apoiam o pequeno e grande produtor rural.

Com base nos novos modelos de produção e expansão do mercado internacional, instituídos ao longo dos anos, novos riscos surgiram, comprometendo a qualidade e inocuidade dos produtos. Somado a isto e considerando os parâmetros internacionais, visando tornar cada vez mais os produtos de origem animal, seguros ao consumo, foram estabelecidas normas para avaliação de controle dos processos e produtos a serem executadas tanto pelo SIF quanto pelas indústrias.

O SIF é responsável pela execução da inspeção e fiscalização sanitária dos abatedouros frigoríficos e estabelecimentos que manipulam, preparam e industrializam produtos de origem animal. Este serviço é vinculado e supervisionado pelo DIPOA, Órgão que tem por objetivo assegurar a qualidade de produtos de origem animal comestíveis e não comestíveis destinados ao mercado interno e externo, como também dos produtos importados. Atualmente, o SIF atua em mais de 5 mil estabelecimentos brasileiros, visando garantir produtos com certificação sanitária e tecnológica para o consumidor, respeitando as legislações nacionais e internacionais vigentes (BRASIL, 2022).

No sentido de atender as necessidades da fiscalização agropecuária com resultados confiáveis, uma rede de laboratórios atua para fornecer dados técnicos e resultados de análises laboratoriais, ao DIPOA, das amostras enviadas pelo SIF. Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA), são os laboratórios oficiais do MAPA e estão vinculados à Secretaria de Defesa Agropecuária, por meio da Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários – CGAL.

Com o objetivo de desenvolver uma gestão microbiológica do sistema de inspeção brasileiro, em 25 de janeiro de 2013, através da Portaria SDA nº 17/2013, foi criada, por meio dos esforços entre o governo e comunidade científica, a Comissão Científica Consultiva em Microbiologia de Produtos de Origem Animal, dando origem aos programas de controle oficiais em vigor.

Dentre tais programas, há o Programa Nacional de Controle de Patógenos – PNCP, ferramenta que possibilita identificar a prevalência dos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, em produtos de origem animal produzidos pelos estabelecimentos brasileiros registrados junto ao SIF e reportar tais resultados ao DIPOA, órgão que tomará as medidas de controle e monitoramento com o intuito de garantir produtos livres desses patógenos, considerados de alto risco para a saúde pública (BRASIL, 2017).

O Brasil é um dos maiores produtores de carne de frango do mundo: dados do

Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) apontam o país como o maior fornecedor global, com estimativa de liderança no ranking pelos próximos dez anos (USDA, 2022). De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), mesmo enfrentando dificuldades pela recuperação do mercado pós pandemia, a produção e exportação da carne de frango cresceram. Em 2021 foram produzidas 14,329 milhões de toneladas de carne de frango, deste total 67,83% foram destinados ao mercado interno e 32,17% a exportações (ABPA, 2022).

Sendo a carne de frango tão importante para o mercado produtor e consumidor brasileiro, é de grande relevância para a saúde pública a análise das carcaças. Dentro dos microrganismos monitorados pelo PNCP, a *Salmonella* spp. tem relevância por fazer parte da microbiota gastrointestinal das aves e por estar associada, com frequência, a relatos de surtos de contaminações alimentares por todo o mundo.

Mesmo com todos os avanços tecnológicos envolvidos na cadeia produtiva da carne de frango, a contaminação da carcaça pode ocorrer, caso não sejam tomadas todas as medidas de higiene. As condições de manejo, durante o processo de abate do frango, irão determinar a presença e a quantidade de *Salmonella* na carcaça (CARVALHO; CORTEZ, 2005).

A salmonelose é mundialmente conhecida como uma doença de origem alimentar com morbidade e mortalidade significativas (FORSYTHE, 2013), como também gera perdas econômicas consideráveis, afetando tanto a saúde pública quanto a economia.

O presente trabalho tem como objetivo apontar a frequência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos, que pertencem ao PNCP/MAPA e analisadas no período de 14 de fevereiro a 26 de maio de 2022, pelo setor de Microbiologia dos alimentos do LFDA/PE.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SALMONELLA spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Foi isolado pela primeira vez por Daniel E. Salmon (1850-1914), médico veterinário bacteriologista. São bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, sendo a maioria móvel pela presença de flagelos peritríquios (com exceção a *S. pullorum* e a *S. gallinarum* que são imóveis), produtores de gás por meio da glicose (com exceção a *S. Typhi*), capazes de usar o citrato como única fonte de carbono e considerados microrganismos patogênicos zoonóticos. Com distribuição

cosmopolita, são encontrados frequentemente no trato intestinal dos seres humanos e outros animais. A temperatura ótima de multiplicação é de 35°C a 37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 45°C (FRANCO;LANDGRAF, 2005; CORCORAN, 2013; MELO, 2020).

Dentro do gênero ocorre a classificação de duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*: juntas representam 99% dos isolados positivos em humanos. A espécie *S. enterica* abrange mais de 2500 sorotipos e é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, e *indica* (McVEY et al, 2017; BRASIL, 2011).

A classificação em espécies é pouco usada nos estudos epidemiológicos, sendo mais usual a classificação baseada no Esquema de Kauffman-White, dividindo em sorogrupos e sorovares, através da presença dos antígenos O (somático), H (flagelar), e Vi (capsular). O antígeno O caracteriza os sorogrupos de *Salmonella* spp., e são comuns a muitos sorovares. Já o antígeno H distingue-se pela composição protéica dos flagelos: grande parte das células de *Salmonella* podem expressar dois diferentes antígenos H, sendo denominadas difásicas. Cada antígeno O e H tem uma identificação numérica. Cepas que não expressam o antígeno O são descritas como irregulares na estrutura antigênica (MELO, 2020; CORCORAN, 2013).

Células que expressam apenas um antígeno são denominadas monofásicas, podendo acontecer naturalmente em alguns sorovares ou através da perda de um dos genes difásicos (CORCORAN,2013). E o antígeno Vi (capsular), está relacionado à virulência, estando presente em alguns poucos sorotipos, como *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Dublin* (GUIBOURDENCHE et al., 2010; BELL e KYRIAKIDES, 2002).

Na nomenclatura atual, de acordo com as alterações taxonômicas estabelecidas, os sorotipos ou sorovares não são mais consideradas espécies, dessa forma os sorovares não devem ser escritos em itálico ou sublinhado. Em 2004, uma nova espécie foi isolada em um sedimento subterrâneo de solo com baixo pH na Oak Ridge, Tennessee - EUA (Estados Unidos da América), denominada *Salmonella subterranea*, essa amostra apresentou semelhança com *S. bongori*, por meio de sequenciamento 16S rRNA, além de algumas características metabólicas iguais, como indol positivo, H₂S e lisina descarboxilase negativa, pigmento amarelo e um flagelo lateral (BRASIL, 2011).

3.2 SALMONELOSE

No Brasil, dados do Ministério da Saúde de 2012 a 2021 apontam a *Salmonella* spp. como

o agente etiológico que ocupa o terceiro lugar na lista de patógenos que mais provocaram surtos de doenças transmitidas por alimentos (BRASIL, 2022).

Neste contexto, a *Salmonella* provoca três tipos de doenças: a febre tifóide, causada pela *S. Typhi*; as febres entéricas, causadas pela *S. Paratyphi*; e as enterocolites ou salmoneloses, provocadas pelas demais salmonelas (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Salmonelose é uma das doenças de origem alimentar mais comuns a nível mundial, considerada uma zoonose, que afeta a saúde pública, provocando surtos (MENDONÇA, 2016).

A *Salmonella* possui mais de 200 fatores de virulência, onde estão codificados em pelo menos cinco ilhas de patogenicidade. Os microrganismos penetram por via oral através de água e alimentos contaminados: a bactéria invade as células do baixo trato intestinal pela indução de rearranjos de actina, o que resulta em formação de pseudópodos que engolfam a bactéria. A sua adesão às microvilosidades provavelmente ocorre por meio de adesinas (fímbria do tipo I sensível à manose). A *Salmonella* penetra nas células epiteliais do intestino. Mesmo não sendo fagocitada, a bactéria utiliza o sistema de secreção do Tipo III para injetar vários fatores bacterianos na célula hospedeira, afetando o metabolismo dessa célula (LY; CASANOVA, 2007).

Rearranjos de actina do enterócito ocorrem abaixo da bactéria aderida, provocando uma mudança na aparência da célula hospedeira, lembrando uma gota. A seguir, ondulações da membrana plasmática (ruffling) resultam em macropinocitose e no engolfamento da bactéria dentro do vacúolo endocítico. A depender da espécie de *Salmonella* pode ocorrer dois sistemas de secreção do Tipo III: um para invasão e um para sobrevivência intracelular. O patógeno evita a fusão lisossomal por causa do sistema de secreção do Tipo III, o que provoca divergência na via normal do vacúolo que entregaria o material para o lisossomo. A bactéria permanece no vacúolo e multiplica-se, podendo causar a morte da célula hospedeira. Sua sobrevivência prolongada está associada a um plasmídeo de virulência que codifica os fatores necessários (FORSYTHE, 2013).

A dose infectante varia de 10^5 a 10^8 células, porém, em pacientes imunocomprometidos, têm sido observadas doses $\leq 10^3$ para alguns sorovares envolvidos em surtos de doenças de transmissão alimentar – DTA. Em casos crônicos a enterocolite aguda, causada pela ação da bactéria no organismo, pode provocar um quadro diarreico moderado, sem a presença de sangue, mas, não está isenta a ocorrência de uma perda de pequeno volume de sangue junto as fezes. O mecanismo de transporte do microrganismo no hospedeiro, através do sistema retículo endotelial, associado à capacidade de multiplicação no interior dos macrófagos, resulta numa manutenção e disseminação no organismo (BRASIL, 2011).

Os sintomas da febre tifóide são mais graves e incluem septicemia, febre alta, diarreia e

vômito. A febre entérica é semelhante a febre tifóide, mas os sintomas são mais brandos com menor duração. A salmonelose, dependendo da quantidade de bactérias ingeridas e do estado de saúde do hospedeiro, pode provocar em poucos dias sintomas severos, incluindo diarreia, febre, dores abdominais, vômito e lesões a órgãos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

O trato intestinal, de diversas espécies de animais, é considerado reservatório de *Salmonella*. Dessa forma é possível observar a capacidade dessa bactéria em sobreviver a ambientes diversos, o que explica seu potencial de disseminação elevado. O frango de corte se destaca como reservatório e está relacionado a alta frequência de contaminação do produto final no abatedouro-frigorífico, comprometendo a carne de frango e seus derivados como os responsáveis pela transmissão de *Salmonella* ao homem, sendo assim fator de risco para infecção humana (EFSA, 2015; FAO / WHO, 2009).

Vários estudos apontam os produtos avícolas como fontes principais de casos de salmonelose, na Europa: a EFSA - *European Food Safety Authority* determinou o controle de *Salmonella* spp. como prioritário na produção de aves e ovos. Na carcaça, as muitas etapas de criação, transporte e produção podem favorecer a contaminação da carne. Nos ovos a contaminação ocorre de 2 maneiras: transmissão vertical e transmissão horizontal. A transmissão vertical acontece quando os ovários e ovidutos das aves estão contaminados. Assim o patógeno consegue alcançar o interior dos ovos, antes da casca ser formada. Já na transmissão horizontal, devido a presença de *Salmonella* spp. nas fezes da ave, o ovo é contaminado durante a passagem pela cloaca (HESSSEL, 2020).

A epidemiologia é bastante complexa. É importante para o controle e prevenção identificar e eliminar os fatores que favoreçam a multiplicação deste microrganismo. Apesar de todos procedimentos realizados na busca a garantir a produção da carne de frango com qualidade microbiológica adequada e dos desenvolvimentos tecnológicos alcançados e adotados no setor avícola brasileiro, a *Salmonella* ainda está presente por toda cadeia de produção do frango de corte. Desta maneira, são necessárias medidas conjuntas como adoção de práticas higiênicas na criação, prevenção de contaminações cruzadas, controle microbiológico das rações oferecidas aos animais, entre outras, que contribuam para a redução dos níveis de contaminação das carcaças (MENDONÇA, 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL

O estudo foi realizado no setor de Microbiologia dos Alimentos do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco – LFDA/PE, localizada no Bairro de Dois irmãos, na cidade de Recife-PE. Possui as seguintes coordenadas geográficas: latitude 8° 04'03''S; longitude 34°55'00'' O; e com altitude meradia em relação ao nível do mar de 4 metros. Segundo classificação de Köppen, o clima da região era do tipo As' – tropical quente e úmido, com verão seco e chuvas de outono-inverno. Apresenta temperatura meradia anual de 25°C e umidade relativa do ar meradia anual de 80%, com baixas amplitudes terarmicas.

4.2 AMOSTRAGEM

O período de análise dos resultados compreendeu de 14 de fevereiro a 26 de maio de 2022. Nesse intervalo de tempo, todas as carcaças de frango de corte que chegaram ao LFDA/PE para análise de *Salmonella*, dentro do PNCP, foram acompanhadas nas etapas de processamento para detecção do microrganismo. Ao final do mês de maio foi realizado o levantamento dos resultados obtidos. A quantidade de carcaças, por semana, destinadas ao laboratório, foi determinada pelo cronograma oficial dos fiscais federais. Ao total foram analisadas 52 carcaças durante as 15 semanas de atividades estabelecidas. A carcaça vem inteira, isolada e lacrada através de embalagem oficial, com o número do SIF junto à SOA, devidamente identificada com os formulários oficiais, como também acondicionada e transportada de acordo com as normas técnicas do protocolo federal para a análise de *Salmonella* dentro do PNCP/MAPA. A detecção laboratorial da *Salmonella* spp. se faz por meio da metodologia *International Standard Organization* (ISO) 6579-1/2017.

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

As etapas para o isolamento e identificação de *Salmonella* spp. requer 4 estágios sucessivos que serão descritos a baixo:

I. Pré-enriquecimento em meio líquido seletivo

Ao receber a carcaça no laboratório, o analista verifica todas as informações e solicitações

referente aquela amostra. Em seguida se realiza a pesagem da alíquota necessária para o processamento (Figura 29 A). Na detecção de *Salmonella* spp. se retira pedaços da musculatura do frango de várias regiões até se obter 25 gramas de carne (Figura 29 B). Toda essa etapa ocorre dentro do fluxo laminar de pesagem, previamente higienizado, onde se utiliza tesoura, bisturi, balança, pinças, bandejas e sacos de pesagem estéreis tipo *stomacher*.

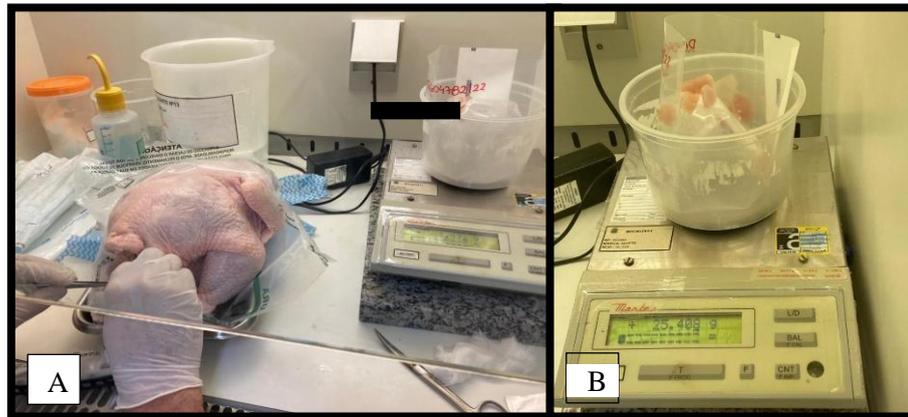


Figura 29. A) Pesagem da alíquota para o processamento B) 25 gramas retirados da musculatura do frango.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Na sequência foi adicionado junto à amostra 225mL de água peptonada tampão 1% em temperatura ambiente (Figura 30). Na continuidade, a amostra é incubada em estufa a 37°C por 24 horas.



Figura 30. 25 gramas da carcaça em saco de pesagem que receberá 225mL de água peptonada tampão 1%.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

II. Enriquecimento em meio seletivo

Após a pré-incubação, alíquotas do caldo da cultura é distribuído em tubos de ensaio contendo dois tipos de meio seletivo. A metodologia oficial preconiza o Rappaport – Vassiliadis Semissólido Modificado (MSRV) ou o caldo Rappaport – Vassiliadis Soja (RVS), neste caso o caldo de escolha do laboratório é o RVS pela sua capacidade em detectar cepas não móveis de *Salmonella* spp. E o segundo meio de escolha, seguindo a metodologia oficial é o caldo nutritivo de Tetrathionato – novobiocina de Muller – Kauffmann (MKTTn).

Dessa forma, na bancada proximo ao Bico de Bunsen, é pipetado 0,1 mL da cultura e adicionado a 10 mL do caldo RVS, na sequência é incubado em estufa a 42°C (Figura 31) por 24 horas. Já no segundo caldo, é pipetado 1 mL da cultura e adicionado a 10 mL do caldo MKTTn, emseguida se incuba em estufa a 37°C por 24 horas.



Figura 31. Alíquota de amostras incubadas em caldo RVS a 42°C.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

A finalidade do caldo Rappaport é inibir o crescimento de outros microrganismos presentes na amostra, permitindo o crescimento de diferentes espécies de *Salmonella* spp. (SILVA, 2017). É indicativo de presença de *Salmonella* spp. a turbidez do meio Rappaport de azul límpido para azul claro (ALAMOS, 2020).

Em todas as análises se usa uma amostra branca e uma amostra controle positivo, com sua viabilidade previamente testada, no intuito de se comprovar a eficácia dos meios e metodologia utilizada nos ensaios. O monitoramento das temperaturas das estufas, a higienização das estufas, fluxos laminares e utensílios, a correta utilização dos equipamentos, como também o descarte correto dos materiais contaminados evita que as análises sejam comprometidas por erros nos resultados e possíveis contaminações cruzadas.

III. Emplacando em meio sólido seletivo

Das culturas obtidas da etapa anterior, segue para o emplacamento em meios sólidos seletivos. Os ágar preconizados são o ágar XLD e ágar Rambach. Na bancada, próximo ao Bico de Bunsen, se retira uma alçada dos caldos enriquecidos, tanto o Caldo RVS quanto o caldo MKTTn, e se realiza o método de esgotamento em placa para cada ágar (Figura 32).

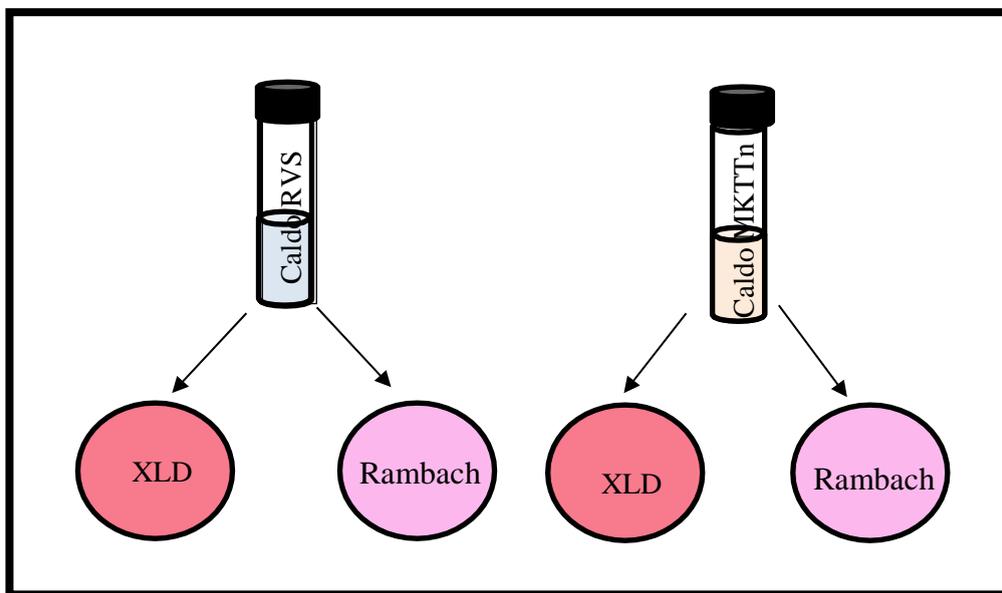


Figura 32. Esquema de distribuição dos caldos enriquecidos nos ágar seletivos.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Após a distribuição dos caldos enriquecidos incubados nos ágar sólidos seletivos, todas as placas semeadas seguem para incubação em estufa a 37°C por 24 horas. A Lisina presente no ágar XLD serve para a diferenciação da *Salmonella*, dessa maneira, com o esgotamento da Xilose, *Salmonella* spp. descarboxila a lisina causando uma reversão às condições alcalinas. O ágar Rambach contém substratos cromogênicos que possibilitam diferenciar as colônias de *Salmonella*, uma vez que, outros microrganismos tendem a ficar com a coloração azul-verde neste ágar.

IV. Confirmação

Das placas semeadas, são selecionadas 5 colônias típicas ou suspeitas para serem testadas nas etapas seguintes. As características da *Salmonella* spp. no ágar XLD são colônias vermelhas com centros pretos. Já no ágar Rambach as colônias apresentam coloração margenta.

Após a seleção, as colônias passam por novo estriamento em placa com ágar não seletivo, o de escolha pela metodologia oficial é o ágar nutriente, sendo incubado em estufa a 37°C por 24 horas. Na sequência, as colônias seguem para a confirmação através de testes bioquímicos tradicionais como TSI, Ureia e Lisina, ou automatizado por meio do VITEK 2 compact® (Figura 33).



Figura 33. Confirmação automatizada por meio do VITEK 2 compact®.

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Na etapa seguinte, após os testes anteriores apontarem resultados positivos para *Salmonella* spp. são realizados testes sorológicos com os antígenos O (somático), H (Flagelar) e VI (Polivalente). De acordo com a Instrução Normativa N° 20, de 21 de outubro de 2016 (IN°20) do MAPA, as colônias positivas devem ser enviadas ao LFDA em São Paulo para a tipificação e estudo epidemiológico de prevalência dos sorovares circulantes no Brasil, sendo transferidas do ágar nutriente, para o ágar estoque inclinado e são incubadas em estufa a 37°C por 24 horas, após esse período são armazenadas em caixa específica para transporte.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 52 carcaças analisadas, no período de 14 de fevereiro a 26 de maio de 2022, 5 apresentaram presença de *Salmonella* spp. nos resultados finais dos ensaios (Quadro 2), neste caso a frequência foi de 9,6%.

Quadro 2. Resultado obtido das análises de pesquisa de *Salmonella* spp nas carcaças de frango dentro do PNCP/MAPA no LFDA/PE.

Presença de <i>Salmonella</i> spp em carcaças de frango		
Mês	Quantidade analisadas	Positiva
Fevereiro	11	0
Março	13	3
Abril	14	0
Maior	14	2
Total=52		

Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Destacar o quadro: melhorar

Em uma pesquisa realizada por Yamaguchi (2013) com a detecção de *Salmonella* em carcaças de frango, apontou uma positividade de 3,65%. Para Revollo (2005), a presença de *Salmonella* spp. nas carcaças de frango pode estar relacionada com a colonização intestinal. A *Salmonella enteritidis* e outros sorotipos, coloniza tanto o intestino como outros órgãos internos como folículos ovarianos, oviduto, fígado, pâncreas, baço e vesícula biliar, desde os primeiros dias de vida da ave.

De acordo com Sharma et al. (2015), o processo de abate e corte de carcaças resulta na exposição de superfícies musculares, o que torna a carne bastante suscetível à contaminação bacteriana. Para ser considerado um alimento com qualidade ideal, é utilizado o plano de amostragem para patógenos perigosos, como a *Salmonella* spp., dessa forma, se uma amostra estiver contaminada o lote todo está inaceitável e impróprio para o consumo (ALAMOS, 2020).

É ainda durante o abate que a contaminação das carcaças pode ocorrer por microrganismos patogênicos associados às fezes, à pele e ao pelo do animal, levando ao comprometimento do produto final. A higiene é um fator importante para se evitar a disseminação e contaminação da carcaça, e deve perpassar por todas as etapas, como também estar presente na rotina dos funcionários que estarão em contato direto com o produto (REIS; VELOSO, 2002).

Mendonça et al. (2016) apontam os principais fatores que podem contribuir para a disseminação e contaminação de *Salmonella* spp. entre os frangos nas granjas: a ração contaminada (principalmente as que tem como matéria prima produtos de origem animal); a alta frequência de roedores e insetos como a mosca, no ambiente, uma vez que esses animais podem carrear das fezes, a bactéria, para a ração dos frangos; os ácaros que adquirir o patógeno ao picar a ave, atuando como vetores de *Salmonella*; as aves selvagens e migratórias que são reservatórios ou vetores mecânicos; pintainhos infectados; a falta de protocolos de higiene e interação das pessoas que manejam as aves, como outras aves infectadas.

Segundo Baptista et al. (2018), a relação entre o aumento na produção e consumo da carne de frango junto ao aumento significativo de casos de DVAs, determinou como medida de auxílio a saúde pública, o surgimento de normas adicionais ao PNSA (Programa Nacional de Sanidade Avícola) por meio da instrução normativa nº 78 de 3 de novembro de 2003 que regulamentou o monitoramento permanente da ocorrência de contaminação de carne de frango por *Salmonella* spp por meio do SIF.

Dentre as cepas de *Salmonella* que mais causam DVAs os sorotipos S. Enteritidis ou S. Typhimurium são os mais diagnosticados, pelo fato de se adaptarem bem ao frango criado comercialmente, ambos pertencem a espécie enterica e subespécie enterica. (TORTORA, 2017).

A legislação brasileira (BRASIL, 2019) estabelece o padrão de ausência de *Salmonella* em 25g para carne de aves. Este trabalho verificou que cinco amostras analisadas encontravam-se impróprias para o consumo humano.

A prevenção da infecção em humanos pela *Salmonella* spp. pode ser feita por meio de adoção de medidas de controle em todas as etapas da cadeia produtiva da carne de frango, desde a produção agrícola até o processamento, fabricação e preparação de alimentos, tanto pelos estabelecimentos comerciais quanto nas residências, na higienização e preparo dos alimentos (BRASIL, 2011).

6. CONCLUSÃO

De acordo com o resultado obtido de frequência da *Salmonella* spp. em 9,6% do total de carcaças de frangos, que faziam parte do PNCP/MAPA e foram analisadas no período de 14 de fevereiro a 26 de maio de 2022, pelo setor de Microbiologia dos alimentos do LFDA/PE, podemos ressaltar a importância de fiscalizar e analisar amostras de estabelecimentos

registrados ao SIF, no intuito de evitar que ocorra surtos de DVAs provocadas por patógenos que prejudicam a saúde pública como a *Salmonella*. É de grande relevância ainda o treinamento constante das pessoas que trabalham manipulando diretamente as carcaças de frango, como também incentivar o hábito de higiene pessoal e do local de criação e abate das aves, no intuito de prevenir possíveis contaminações do produto final.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A experiência vivida através das atividades de rotina no Laboratório de Microbiologia dos alimentos do LFDA/PE, foi de grande importância para a elucidação da atuação do profissional médico veterinário como peça relevante na fiscalização federal de produtos de origem animal.

O aprendizado sobre as metodologias utilizadas na pesquisa de muitos patógenos de grande interesse na saúde pública, tanto a nível nacional como internacional, leva à percepção do notável esforço das entidades públicas envolvidas em desenvolver cada vez mais normas e tecnologias que coloquem os produtos brasileiros como referência no mercado consumidor mundial de produtos de origem animal, tornando o país importante competidor na produção e comércio internacional.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.R; MOSS, M.O. Food Microbiology. 3ª edição. Guildford: RSC Publishing, 2008. 463p.
- ALAMOS, Cindy Ellen Vargas et al. ANÁLISE DA PRESENÇA DE SALMONELLA SPP. EM MAIONESES CASEIRAS DAS REGIÕES UNIVERSITÁRIAS DE CUIABÁ E VÁRZEA GRANDE-MT. **TCC-Biomedicina**, 2020.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Relatório Anual 2022. Disponível em <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2022/05/Relatorio-Anual-ABPA-2022-1.pdf>. Acesso em: 22/08/2022.
- BAPTISTA, Daniela Q. et al. Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de Salmonella spp. isolados de frangos vivos e carcaças no estado do Rio de Janeiro. Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 38, n. 7, p. 1278-1285. Jul. 2018.
- BELL, C.; KYRIAKIDES, A. Salmonella: a practical approach to the organism and its control in foods. Iowa: Blackwell Science, 2002.
- BRASIL, 2016. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA). Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/lfda>. Acesso em: 20/04/2022.
- BRASIL, 2017. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Controle de Patógenos. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos>. Acesso em: 30/08/2022.
- BRASIL, 2019. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em 18/09/2022.

BRASIL, 2022. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Serviço de Inspeção Federal - SIF. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sif>. Acesso em: 10/09/2022.

BRASIL, 2022. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Controle de Patógenos, *Listeria monocytogenes*: Anexo II: lista de produtos para o programa de *L. monocytogenes*. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos/arquivos-controle-de-patogenos/anexo_ii_ni_1.pdf. Acesso em: 30/08/2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 20, de 21 de outubro de 2016. Estabelece o Controle e o Monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, Escola Nacional de Administração Pública 33 registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 205. 2016(b).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil - Informe 2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf>. Acesso em: 15.09.2022.

CALDORIN, Marielle et al. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Bepa-Boletim Epidemiológico Paulista**, p. 4-20, 2013.

CARVALHO, A. C. F. B. de; CORTEZ, A. L. L.. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. *Cienc. Rural*, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, 2005.

CORCORAN, M. *Salmonella enterica* - biofilm formation and survival of disinfection treatment on food contact surfaces. 2013. National University of Ireland, Galway.

DE PAULA, Cheila Minéia Daniel; CASARIN, Letícia Sopenã; TONDO, Eduardo Cesar.

Escherichia coli O157: H7—patógeno alimentar emergente. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 4, p. 23-33, 2014.

DESORDI, Letícia Goulart. Análise da seguridade alimentar como parte da política da Secretaria de Defesa Agropecuária: os programas de controle dos alimentos de origem animal. 2020.

EFSA - European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, v. 13, n. 1, 162 p., 2015.

FAO / WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. Salmonella and Campylobacter in chicken meat: Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 19, Rome, 56p., 2009.

FENG, P.; WEGANT, S.D.; JINNEMAN, K. Diarrheagenic Escherichia coli. Bacteriological Analytical Manual. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Capítulo 4A, revisão fevereiro 2011. Acesso em: 03/09/2022.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da segurança dos alimentos. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2005, 196p.

FRANZ, Eelco et al. Exploiting the explosion of information associated with whole genome sequencing to tackle Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) in global food production systems. **International journal of food microbiology**, v. 187, p. 57-72, 2014.

GANDHI M.; CHIKINDAS, ML. Listeria: A Foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. v.113, n.1, p.1-15. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17010463/>. Acesso em: 30/08/2022.

GASANOV, Uta; HUGHES, Denise; HANSBRO, Philip M. Methods for the isolation and

identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 5, p. 851-875, 2005.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, Paris, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

HESSEL, Claudia Titze. Avaliação quantitativo risco de *Salmonella* spp. em frango e em ovos produzidos sob inspeção oficialno Brasil. 2020.

LUCATELLI, Adriana. **Escherichia coli produtora de toxina de Shiga em carne moída comercializada na cidade de São Paulo, SP**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LY, K.T. & CASANOVA, J.E. Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cell. Microbiol.* 9, 2103–2111. 2007.

MCLAUCHLIN J,. The Relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*. V. 7, Issues 4–5. p. 187-193. 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713596000382>. Acesso em: 30/08/2022.

McVEY, Scott et al. *Microbiologia Veterinária*. 3º edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koong. 2017. 78 p.

MELO, Nataly S. S. Detecção de genes de resistência em isolados de *Salmonella* spp. formadores de biofilme oriundos de carcaças de frango in natura comercializadas em mercados públicos da cidade do Recife – PE. 2020. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de PósGraduação em Biociência Animal, Recife, 2020.

MENDONÇA, Eliane Pereira et al. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. 2016.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella* / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

NATARO, James P.; KAPER, James B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

PAIM, Daniel Santos. Perfil de excreção de *Salmonella* em suínos ao abate e presença de carcaças positivas no pré-resfriamento. 2016.

REIS, C. B. C. dos; VELOSO, G.. Monitorização da contaminação microbiana de carnes de bovino durante o abate. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS SPCV, Oeiras, PT. Anais... Oeiras, Portugal, 2002. p. 289-290, 2002.

REVOLLEDO, L. Estudo da resposta imune, da colonização e invasão por *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorotipo Typhimurium Nalr em frangos de corte, tratados com glucano, probióticos e produtos de exclusão competitiva. 2005. 121f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ROCOURT J.; JACQUET C.; REILLY. A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*. v.62, n. 20, p. 197-209. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11156263/>. Acesso em: 05/08/2022.

SERGELIDIS, D. et al. Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *Intern. Journ. Microb.*, n. 34, p. 171-177, 1997.

SHARMA, K.P.; CHATTOPADHYAY, UK. Assessment of microbial load of raw meat samples sold in the open markets of city of Kolkata. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 8(3):24–7, 2015.

SILVA, Maria Cristina Delgado Da; HOFER, Ernesto; TIBANA, Anita. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.

SILVA, Neusely da; et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. Blucher, 2017.

TORTORA, Gerard J. Microbiologia. 12ª edição. Porto Alegre. Editora Artmed. 2017. 774 p.

USDA. Produção de carne de frango - Resumo dos principais países. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2022. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads>. Acesso em: 03/09/ 2022.

YAMAGUCHI, Mirian Ueda et al. Qualidade microbiológica de alimentos e de ambientes de trabalho: pesquisa de *Salmonella* e *Listeria*. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 6, n. 3, 2013.