

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**COORDENAÇÃO DE ALIMENTOS**  
**CURSO SUPERIOR EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**BERNARDO BORBA SEVERO**

**IDENTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA SPP* PARA CONTROLE DE  
QUALIDADE EM FRIGORÍFICO SUÍNO E FÁBRICA DE EMBUTIDOS  
VIA PCR**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PONTA GROSSA**

**2012**

**BERNARDO BORBA SEVERO**

**IDENTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA SPP* PARA CONTROLE DE  
QUALIDADE EM FRIGORÍFICO SUÍNO E FÁBRICA DE EMBUTIDOS  
VIA PCR**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial à  
obtenção do título de Tecnólogo do Curso  
Superior de Tecnologia em Alimentos da  
Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná.

Orientadora: Juliana Messias Vitória  
Bitencourt, PhD.

Co-orientadora: Renata Samulak

**PONTA GROSSA**

**2012**



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Campus Ponta Grossa  
Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos  
Curso Superior de Tecnologia em Alimentos



---

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **IDENTIFICAÇÃO DE SALMONELA spp. PARA CONTROLE DE QUALIDADE EM FRIGORÍFICO SUÍNO E FÁBRICA DE EMBUTIDOS VIA PCR**

por

**BERNARDO BORBA SEVERO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado no dia 10 de outubro de 2012 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

**Profa. Dra. Juliana Vitoria Messias Bittencourt**  
Professora Orientadora

---

**Profa. Me. Renata Louise Samulak**  
Membro titular

---

**Profa. Dra. Sabrina Ávila Rodrigues**  
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se arquivado na Secretaria Acadêmica -

## RESUMO

SEVERO, Bernardo. **Identificação de *Salmonella spp* para controle de qualidade em frigorífico suíno e fábrica de embutidos via PCR.** 2012. 35 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso Tecnologia em Alimentos - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2012.

A crescente exigência dos mercados consumidores por produtos cárneos de qualidade e com segurança vem exigindo do setor produtivo uma contínua adaptação. A *Salmonella* sp. destaca-se como uma das principais bactérias patogênicas na cadeia de produção suína. O controle dos pontos de contaminação no processo de abate e embutimento de produtos suínos pode reduzir ou eliminar as taxas de ocorrência no produto final, aumentando a segurança do produto e a competitividade no mercado. O presente estudo teve como objetivo a avaliação da presença de *Salmonella* sp. pela técnica da reação em cadeia da polimerase – PCR em um abatedouro de suínos e fábrica de embutidos localizada na região dos Campos Gerais. Foram coletadas 17 amostras de diferentes etapas da linha de processamento. A *Salmonella* sp. foi encontrada em 94% das amostras. A previsão inicial e o principal objetivo deste trabalho em avaliar a presença de *Salmonella* sp. pelo método da PCR em amostras de diferentes pontos do processo produtivo da unidade de abate de suínos e fábrica de embutidos foi alcançado.

**Palavras-chave:** Suínos. Pontos de contaminação. *Salmonella spp*. Controle de Qualidade. PCR.

## ABSTRACT

SEVERO, Bernardo. **Diagnostic PCR for Detection of *Salmonella spp.* in pig slaughter house and swine products factory.** 2012. 35 leaves. Trabalho de Conclusão de Curso Tecnologia em Alimentos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2012.

The consumer requirement markets for meat products quality and safety is growing. The productive sector is in continuous adaptation. *Salmonella sp.* stands out as a major pathogenic bacteria in swine production chain. The control points of contamination if used in the process of killing and inlay pork products can reduce or eliminate the occurrence rates in the final product. This fact increases product safety and market competitiveness. This study aimed to evaluate the presence of *Salmonella sp.* by PCR method in a pig slaughter house and swine products factory located in the region of Campos Gerais. 17 samples were collected at different points of the processing line. The results were positive in 94% of the samples. The main goal of this study to assess the presence of *Salmonella sp.* by PCR method in samples from different points in the production process unit and pig slaughtering factory was reached.

**Keywords:** Swine. Points of contamination. *Salmonella spp.*. Quality Control. PCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de abate e fabricação de embutidos suíno.....	10
Figura 2- Esquema dos processos realizados numa reação de PCR. 1- Primer, 2- Fita dupla de DNA, 3- desnaturação da fita dupla por aumento da temperatura e pareamento dos primers, 4- A enzima Taq DNA Polimerase representada em verde, polimerizam a partir da das extremidades 3' dos <i>primers</i> os desoxinucleotídeos complementarmente às fitas-mãe, 5- Duas fitas-mãe, pareadas com as suas fitas-filha complementares, sintetizadas a partir da adição dos desoxinucleotídeos pela DNA polimerase. ....	16
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 2% do teste piloto.....	23
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos com DNA extraído dos pontos de coleta.....	24
Figura 5 - Visualização da amplificação em gel de agarose utilizando <i>nested</i> PCR. ....	25
Quadro 1 - Pontos de coleta das amostras nas etapas do processo de abate e fábrica de embutidos e suas especificações. ....	18
Quadro 2 - Sequência de <i>primers</i> utilizados para amplificar o <i>invA</i> . ....	20
Quadro 3 - Quantidades de DNA e temperaturas de hibridização utilizadas no teste piloto.....	22
Quadro 4 - Presença de Salmonela nos pontos amostrados. ....	26

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>10</b>
3.1 ABATE SUÍNO.....	10
<b>3.2 SALMONELLA SP.</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR VIA PCR DE AGENTES CAUSADORES DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.</b> .....	<b>14</b>
3.1.1 PCR .....	15
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
4.1 AMOSTRAGEM .....	17
4.1.1 Padronização da amostragem em suabe .....	18
4.2 PRÉ-ENRIQUECIMENTO.....	18
4.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR .....	19
4.3.1 Extração de DNA por lise térmica.....	19
4.3.2 Reação de amplificação de DNA .....	19
4.3.3 Visualização do gel de agarose .....	20
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
5.1 AJUSTES METODOLÓGICOS PARA AMPLIFICAÇÃO.....	22
5.2 PRESENÇA DE <i>SALMONELLA SP.</i> EM PONTOS AMOSTRADOS.....	25
5.3 CONSEQUÊNCIAS DA PRESENÇA DE <i>SALMONELLA SP.</i> NO PROCESSO DE ABATE E FÁBRICA DE EMBUTIDOS. ....	28
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade é atualmente um pré-requisito para o sucesso das empresas. Seu conceito é multidimensional, numa escala de valores permite avaliar e conseqüentemente, aprovar, aceitar ou recusar determinado tipo de produto (DAROT, 2007). A qualidade pode ser definida como o desempenho do produto, resultando em satisfação do cliente. Nos produtos cárneos a qualidade esta relacionada com a qualidade microbiológica e segurança alimentar.

Segundo o CODEX *alimentarius*, alimento seguro é aquele que é produzido sob condições que garantam a integridade, salubridade e sanidade em todos os estágios de seu processo produtivo até seu consumo (SOUSA et al., 2008). Os caminhos para alcançar a qualidade pautam-se no desenvolvimento e aplicação de recursos, ferramentas e sistemas organizados para a obtenção de informações e controle dentro das indústrias transformadoras. O sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC é um exemplo destes sistemas para o controle e gerência da qualidade higiênico-sanitária de alimentos. (MATSUBARA, 2005).

A carne suína é a proteína animal mais consumida no mundo, com uma produção de aproximadamente 100 milhões de toneladas, a produção brasileira ocupa o quarto lugar mundial atrás dos Estados Unidos da America, União Européia e China (MIELE, 2010).

A obtenção higiênica de carnes depende de dois fatores fundamentais: em primeiro lugar da sanidade do animal e em segundo, do ambiente que o cerca até a obtenção do produto processado (OLIVEIRA, 2010). Para Peloso (2000), a produção de suínos vem deixando de ser uma atividade de suinocultores familiares e passando para operações geralmente controladas pelas grandes corporações. Para combater as preocupações que às vezes surgem sobre os processos modernos de produção intensiva, foram desenvolvidos ferramentas de controle para dar aos consumidores a garantia de que certos padrões foram cumpridos na produção da carne que compram, pois esta pode ser veículo para a transmissão de alguns agentes patogênicos, as bactérias de origem entérica (MATSUBARA, 2005), estas bactérias são relacionadas com as doenças transmitidas por alimentos (DTA).

Os principais patógenos ligados a carne suína são a *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* e *C. coli* (BORCH;



NESBASKKEN; CHRISTENSEN, 1996; MAFU et al., 1989; KORSAK et al., 1998, GARCIA, 2002),

Os produtos de origem animal são os alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), sendo que as carnes e produtos cárneos estão em segundo lugar (OMS, 2002). O envolvimento das carnes e produtos cárneos na ocorrência as DTAs se dá pelo fato de que muitos dos agentes patogênicos pertencem à microbiota natural dos animais de corte (trato digestório, narinas, faringe, cavidade bucal, tonsilas e tecido linfático) e contaminam as carcaças durante o abate; ou acabam sendo transportados do ambiente contaminado para as mesmas, pelo manipulador, utensílios, equipamentos ou mesmo a água. (MATSUBARA, 2005).

As atividades da inspeção tradicional de carnes, *ante e post-mortem*, fundamentadas na observação, visualização e exame clínico dos animais, porém a obtenção de carnes inócuas depende também do monitoramento da contaminação das carnes por patógenos entéricos durante o abate (GILL, 1995; TOMPKIN, 1990).

Borch, Nebaskken e Christensen (1996), enfatizam que o abate suíno é um processo aberto com diversas oportunidades de contaminação da carcaça por bactérias patogênicas. Não há nenhum ponto em que os perigos possam ser completamente eliminados, porém há como se reduzir a carga contaminante. Levando este fato em conta torna-se essencial o controle das etapas do processo geral da obtenção da carne visando minimizar os riscos de contaminação e garantindo a seguridade. O plano de APPCC é um programa de controle processo-produto específico capaz de reduzir, prevenir ou eliminar a ocorrência de perigos, como os patógenos nas carnes, identificando quais os perigos significativos em cada etapa, quais são os pontos críticos onde os perigos devem ser controlados e quais são os limites críticos aceitáveis (MARKEY; ROBERTS, 1993; GILL, 1995)

Este trabalho teve como foco a *Salmonella spp*, pois a presença de qualquer sorotipo deste microrganismo em alimentos é motivo para classificá-los como impróprios para o consumo, tanto no mercado nacional como internacional. Isto tem levado a indústria de produtos de origem animal a programar estratégias de controle da qualidade com a finalidade de garantir e comprovar a segurança dos alimentos. Segundo Mattick et al. (2002) um dos problemas básicos no isolamento de *Salmonella* é o pequeno número em que se encontram em relação à quantidade de outras bactérias competidoras, portanto havendo a necessidade de lançar mão de

métodos alternativos a microbiologia convencional. O tempo de obtenção de diagnósticos e a demanda de materiais nos métodos convencionais apontam a necessidade de novos métodos de análises, mais rápidos e simples, a PCR tem se mostrado como alternativa devido sua especificidade e sensibilidade a utilização da técnica permite analisar diversas etapas simultaneamente, agilizando o resultado, sendo capaz de detectar um pequeno número de células bacterianas, contribuindo para veracidade dos resultados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de *Salmonella sp* pelo método de diagnóstico molecular via PCR em amostras coletadas de diferentes pontos do processo produtivo de uma unidade de abate de suínos e fábrica de embutidos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar os pontos de importância para controle da qualidade no abate e processamento de carne suína.

Avaliar a utilização de protocolo de extração de DNA a partir do método de lise térmica com qualidade e quantidade suficiente para uso em PCR.

Ajustar condições de reação para ampliações de DNA em sistema de PCR convencional para *Salmonella sp.*

Discutir suas consequências no processo de abate e fábrica de embutidos.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 ABATE SUÍNO

O processo de industrialização da carne suína em geral é constituído de 18 etapas (Figura 1), a qualidade no produto final é decorrente do controle de todas as etapas, desde o pré abate até a expedição. O período de jejum auxilia a diminuição do conteúdo intestinal e menor risco de contaminação cruzada por bactérias entéricas.

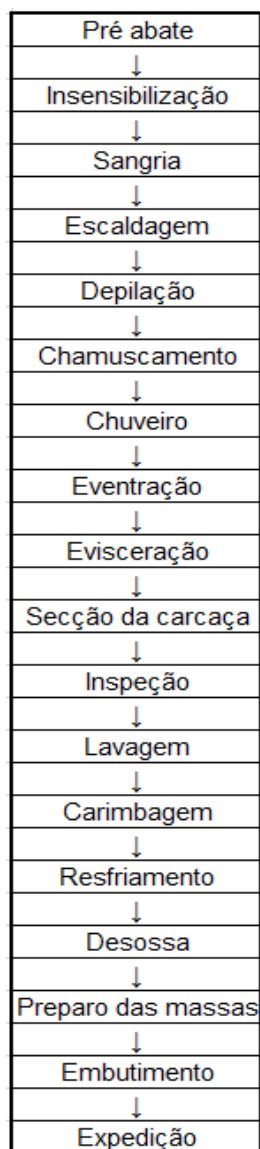


Figura 1 - Processo de abate e fabricação de embutidos suíno.

Fonte: Autoria própria

Segundo Borch, Nebaskken e Christensen (1996), o abate suíno é um processo com diversas oportunidades de contaminação da carcaça por bactérias patogênicas, as fontes geradores de contaminantes são os próprios animais, a partir do conteúdo gastrointestinal, da pele, dos pêlos, da região orofaríngea, além dos operadores e do meio ambiente. A contaminação das carcaças por estas bactérias pode ser limitada somente pelo uso de elevado rigor higiênico nos procedimentos de manipulação dos suínos.

Além disso, a qualidade da carne é influenciada por outros fatores como o estado do animal antes do abate (doenças vindas da “granja”), condições de transporte e manejo inadequado no pré-abate (MAPA, suínos1).

Durante o abate pode haver a contaminação de partes internas que são expostas, incluindo-se os músculos, que anteriormente eram considerados estéreis (GILL et al., 2002). Animais aparentemente são, ou seja, livre de sintomas podem portar bactérias como a *Salmonella sp.*, na etapa de evisceração o trato digestório pode ser um veículo de contaminação cruzada das carcaças dentro do processo de abate (MATSUBARA, 2005).

Durante o abate suíno, a prevenção de risco de contaminação é limitada. Ao final do abate, a proporção de carcaças contaminadas pode variar bastante, de 0 a 100%, embora a maioria dos autores aponte para ocorrência entre 5 e 30%(MORGAN; KRAUTIL; CRAVEN, 1987; OOSTEROM; NOTERMANS 1983 apud BERENDS et al, 1997; VAN DER PALEN et al., 1992 apud BERENDS et al., 1997). Porém é possível reduzir a contaminação utilizando-se práticas preventivas, como as Boas Práticas de Fabricação - BPF e os Procedimentos Operacionais Padrão - POPs (BORCH; NEBASKKEN; CHRISTENSEN, 1996).

Além do mais é preciso gerenciar determinadas etapas capazes de reduzir, prevenir ou mesmo eliminar um perigo através da implementação de um plano de APPCC. Vários autores têm se dedicado ao estudo do abate de suínos sob a ótica do sistema APPCC (BERENDS et al., 1997; BORCH; *et al.* 1996; PEARCE et al., 2004). Os Pontos Críticos de Controle (PCC), aqueles procedimentos ou etapas nos quais um controle específico se faz estratégico, em virtude do risco direto de contaminação, no qual uma ação é capaz de impedir, reduzir ou eliminar a presença do perigo (MATSUBARA, 2005).

Berends, Van Kapen e Snidjers (1996) consideram as etapas de chamoamento, evisceração e inspeção de linfonodos, pontos críticos de controle para controle de *Salmonella sp.* no processo de produção de carne suína.

A Portaria número 46 do MAPA (BRASIL, 1998a) estimula a implementação do sistema APPCC para plantas onde ocorre abate suíno. Segundo Nascimento (2002), até 2000, praticamente somente empresas exportadoras haviam implementado este sistema, frigoríficos que atendem exclusivamente o mercado interno estão em fase de desenvolvimento, tanto na sua execução prática, quanto na sua formalização em documentos, registros e controles.

Com a implementação desse sistema é possível identificar os pontos críticos de controle (PCC), ou seja, etapas do processo nas quais um controle específico se faz estratégico, em virtude do risco direto de contaminação, no qual uma ação é capaz de impedir, reduzir ou eliminar a presença do perigo.

Os perigos microbiológicos mais encontrados no abate de suínos são: bactérias patogênicas como *Campylobacter spp*, *Salmonella spp* e *Yersinia enterocolítica*, derivadas do próprio suíno. Outros agentes como *Aeromonas spp*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, presentes no ambiente, também fazem parte destes perigos.

### 3.2 *Salmonella sp.*

De acordo com o International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1996), a *Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*, sendo caracterizadas como bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, na forma de bastonetes. As formas móveis possuem flagelos peritríquios. São capazes de sobreviver por muito tempo nos alimentos e outros substratos.

Segundo Adams e Moss (1995), a temperatura ótima para o crescimento deste microorganismo é de 35 – 37°C, onde a mínima é de 5°C podendo chegar a temperatura máxima de 45°C. O pH ótimo para seu crescimento é 7,0. A atividade de água afeta o crescimento deste microorganismo, esta pode ter valores mínimos de 0,93. São destruídas facilmente por desinfetantes comerciais, utilizados na indústria de alimentos.

Amplamente disseminada na natureza, possui como principais reservatórios os animais e o homem e são freqüentemente causadores de DTAs. A transmissão da *Salmonella* entre espécies ocorre principalmente através dos alimentos (JAY, 2000).

A atual classificação das salmonelas baseia-se principalmente na hibridização DNA/DNA. Segundo esta classificação, o gênero *Salmonella* contém duas espécies, *Salmonella entérica*, subdividida em 6 subespécies e *Salmonella bongori* (LE MINOR, RICHARD, 1993).

Para fins epidemiológicos, as salmonelas podem ser classificadas em três grupos, as que infectam somente as pessoas (são as mais graves, provocam febre tifóide e paratifóide), as sorovariedades adaptadas a hospedeiros (algumas são patógenas para o homem) e as inadaptadas (sem preferência de hospedeiro) que incluem a maioria das sorovariedades transmitidas por alimentos (JAY, 1994).

O sorovar *Typhimurium*, mais comumente isolado de suínos, ocupa a nível mundial, a segunda posição nos isolados humanos (HUMPHREY, 2000). De acordo com Jay (1994), entre as diferentes espécies de *Salmonella*, a *S. choleraesuis*, principalmente encontrada em suínos possui o índice de mortalidade mais alto: 21%.

A dose infecciosa de *Salmonella* é elevada,  $10^6$  (UFC/g ou mL) podendo variar de acordo com a virulência do sorotipo, a sensibilidade do indivíduo e o alimento veiculado (ADAMS & MOSS, 1995). De acordo com Forysthe (2002) a dose infecciosa pode variar de 20 até  $10^6$  células.

A população de maior risco apresenta uma resposta imunológica fraca em função da imaturidade ou do sistema imunológico debilitado, somada, em algumas situações à baixa produção de ácido clorídrico no estômago que favorece a colonização intestinal (GAMARRA, 2007). Da mesma forma o elevado conteúdo de gordura de alguns alimentos proporciona às bactérias certa proteção frente à acidez do estomago, onde pequenos números de células poderá causar infecção a partir desses alimentos (D'AOUST, 1997).

Portadores são como aves, répteis e suínos, que não demonstram sintomas ou alterações orgânicas em virtude da presença do agente são as principais fontes de disseminação (MATSUBARA, 2005).

A presença desta bactéria em suínos portadores foi comprovada por Currier et al (1986); Letellier, Messier e Quessy (1999); Alves et al. (1994); Bessa, Costa e Cardoso (2004).

Sabendo-se da ocorrência de suínos portadores de salmonelas, destaca-se a necessidade de um controle rigoroso das práticas de abate de forma a atender com excelência a conduta técnica que cada procedimento exige, além disso, respeitando elevados padrões de higiene durante todo o processo.

Nos EUA estima-se que são gastos cerca de U\$ 700 para cada caso de *Salmonella* em humano. Na União Européia, calcula-se que a doença causa um custo anual da cerca de EUR 2,8 bilhões com medidas preventivas, curativas e de controle (CFMV, 2004). Na América Latina, *Salmonella sp.* foi a segunda maior causa de infecções veiculadas por alimentos no período de 1995 a 1998 (SANTOS et al. 2003).

A presença de qualquer sorovar em alimentos é motivo para classificar os mesmo como impróprios para consumo. Em 02 de janeiro de 2001 a Agência Nacional de Vigilância sanitária – ANVISA publicou a Resolução RD12, que atribuiu critérios e padrões microbiológicos para os alimentos estabelecendo a ausência de *Salmonella spp* em 25g. (BRASIL, 2001a) Situações de devolução de cargas de produtos, em que havia presença de *Salmonella sp.*, têm preocupado as agroindústrias e estimulado as mesmas a buscar soluções tecnológicas para o problema (KICH & CARDOSO, 2004). Diferentes metodologias de diagnóstico estão sendo empregadas e desenvolvidas para identificação rápida e precisa de *Salmonella sp.* (BOYACHUK et al., 2005).

### 3.3 Diagnóstico Molecular via PCR de agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos

A utilização de métodos de detecção de microrganismos em alimentos é uma das ferramentas utilizadas para garantir a segurança microbiológica dos produtos (FREITAS et al., 2006).

O método oficial de diagnóstico para *Salmonella sp.* é baseado na metodologia de isolamento e seleção em placas denominadas comumente de microbiológico convencional em meios de cultura (BRASIL, 2003). Este método é realizado em 5 etapas: o pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento e seleção, provas bioquímicas, a reação sorológica. Porém o tempo de obtenção de resultados, a utilização de diversos meio de cultura diferentes, a utilização de



vidraria e materiais é muito superior, assim como o tempo para obtenção do resultado, quando comparado com a técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Saiki, et al (1985) e Mullis, et al. (1987) e tem como objetivo multiplicar um trecho específico de DNA (gene ou parte dele, regiões supervariáveis, *Junk DNA*) utilizando desoxinucleotídeos como monômeros até um ponto em que sua concentração seja tão alta que possa ser detectável por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias (VIEIRA, 2002).

Mullis conseguiu especificidade na cópia de apenas segmentos específicos, introduzindo o conceito de *primer* de PCR, e na utilização de uma DNA polimerase estável, contrapondo as grandes quantidades de enzima, então, adicionas a cada ciclo de amplificação, o que influenciava negativamente nas questões de tempo e dinheiro (VIEIRA, 2002).

A introdução da PCR em diagnósticos microbiológicos tem sido estabelecida em pesquisas laboratoriais, visando a padronização de seus regulamentos e instruções, e posteriormente, a aprovação oficial (FREITAS et al., 2006). Rapidez, bom limite de detecção, seletividade e potencial para otimização são suas maiores vantagens (MALDONADO, 2008).

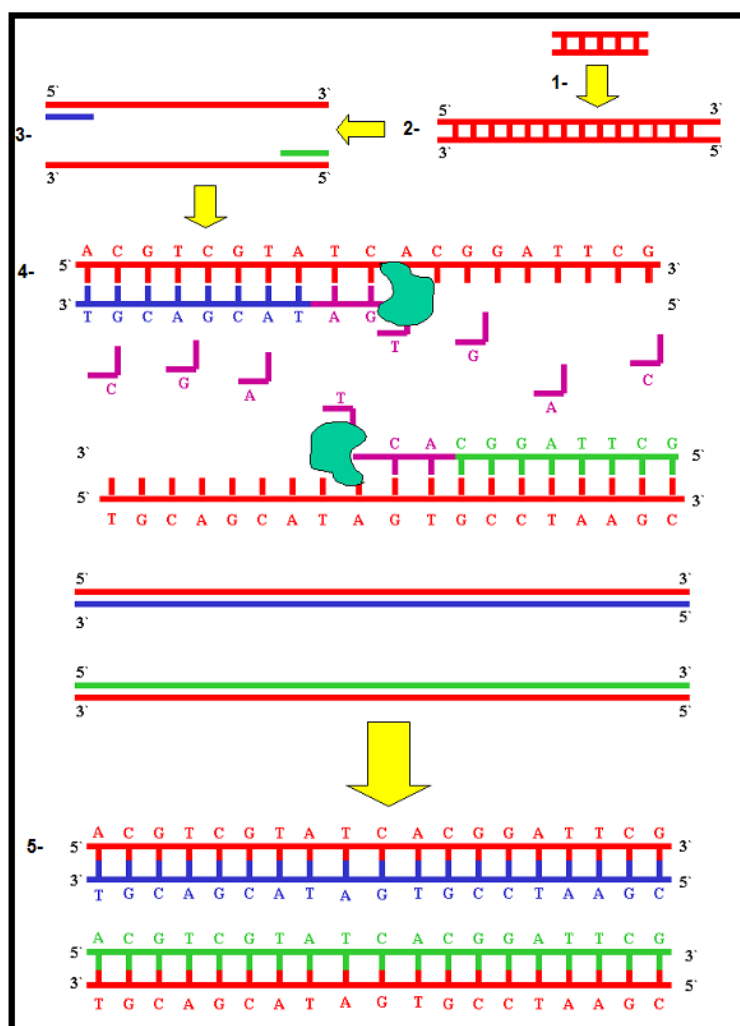
Deve-se considerar que este método, apesar de específico e sensível não demonstra viabilidade celular, indicando que o agente esta ou esteve presente no substrato, podendo ou não estar viável quando da sua identificação. Pode ser útil para monitoramentos dentro dos sistemas de produção, desde a granja ate a industrialização dos produtos, quando se tem por objetivo acompanhar a ocorrência do agente, não sendo relevante a sua situação viável ou não (MALDONADO, 2008).

### 3.1.1 PCR

A multiplicação dos trechos específicos de DNA alvo se dá alternando a temperatura de ensaio entre: a) desnaturação das cadeias do DNA genômico, separação da fita dupla por meio de elevação da temperatura; b) anelamento (hibridização) dos *primers*, usados para delimitar a sequência a ser amplificada; c) temperatura ótima específica da enzima 72°C; d) reinício do ciclo.

Os ciclos são repetitivos de uma forma interativa e consecutiva. Os produtos sintetizados durante o primeiro ciclo servem então de molde para o ciclo seguinte, assim, o número de cópias para um segmento específico é praticamente duplicada a cada ciclo. Desta maneira, 30 ciclos podem produzir uma amplificação do fragmento de DNA de interesse de  $2^{30}$ , isto é 1.073.741.824 fragmentos são gerados, ocorrendo um acúmulo exponencial de fragmentos amplificados (TAYLOR *et al.*, 1995).

As etapas do processo de amplificação podem ser visualizadas na figura 2.



**Figura 2- Esquema dos processos realizados numa reação de PCR. 1- Primer, 2- Fita dupla de DNA, 3- desnaturação da fita dupla por aumento da temperatura e pareamento dos primers, 4- A enzima Taq DNA Polimerase representada em verde, polimerizam a partir da das extremidades 3' dos primers os desoxinucleotídeos complementarmente às fitas-mãe, 5- Duas fitas-mãe, pareadas com as suas fitas-filha complementares, sintetizadas a partir da adição dos desoxinucleotídeos pela DNA polimerase.**

Fonte: Vieira (2002)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo se desenvolveu em uma unidade frigorífica que abate e fabrica embutidos, localizada na região dos Campos Gerais - Paraná. Duas carcaças suínas foram acompanhadas desde o abate até a fabricação de embutidos e durante algumas etapas amostras foram coletadas para verificar os pontos de contaminação por *Salmonella sp.*.

### 4.1 AMOSTRAGEM

A delimitação dos pontos de coleta foi realizada através de levantamento bibliográfico e observações visuais durante o processo de abate e fabricação de embutidos.

Foram escolhidos 17 pontos de coleta durante as diferentes etapas do processo, desde a escaldagem até o embutimento, como demonstrado no Quadro 1.

Etapa	Ponto de coleta	Especificação	Nº
Escaldagem	Água	Água do tanque de escaldagem	1
	C1,1	Carcaça 1 - região lombar após a escalda	2
	C2,1	Carcaça 2 - região lombar após a escalda	3
Evisceração	C1,2	Carcaça 1 - região torácica após a evisceração	4
	C2,2	Carcaça 2 - região torácica após a evisceração	5
	Faca	Faca utilizada para evisceração	6
	Mesa 2	Mesa de evisceração	7
Resfriamento	C1,3	Carcaça 1 – resfriamento	8
	C2,3	Carcaça 2 – resfriamento	9
	Parede	Parede da câmara fria de carcaças	10
Desossa	Mesa	Mesa de desossa	11
	Carne	Carne após a desossa	12
Preparação da massa	Massa	Massa obtida após moagem e mistura	13
	Máquina	Máquina de moagem e mistura	14
	Mão 5	Mão do manipulador	15
Embutimento	Mão 6	Mão do manipulador	16
	Lingüiça	Embutido final	17

**Quadro 1 - Pontos de coleta das amostras nas etapas do processo de abate e fábrica de embutidos e suas especificações.**

**Fonte: Autoria própria**

Os materiais utilizados para a coleta foram: suabes, frasco de coleta estéril (para coleta da água de escaldagem, massa e carne), tubos de ensaio contendo solução água deionizada peptonada tamponada (ADPT) previamente preparada e isopor com gelo para manter a temperatura dos meios e das amostras.

#### 4.1.1 Padronização da amostragem em suabe

A coleta foi realizada utilizando método do suabe, o qual se baseia na técnica do esfregaço em superfície segundo Silva (2007).

Para cada ponto amostrado foi utilizado um suabe, visando padronizar a coleta das amostras o esfregaço foi realizado delimitando uma área de 100 cm<sup>2</sup> (10 cm x 10 cm) e realizado de acordo com a seguinte sequência: higienização das mãos do coletor, manuseio do suabe tocando somente na extremidade oposta tomando cuidado para não contaminá-lo e friccionando-o em zigue-zague nas direções vertical e horizontal.

Após a coleta os suabes foram colocados em tubos de ensaio contendo solução de ADPT e mantidos sob refrigeração durante o transporte até o laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

#### 4.2 PRÉ-ENRIQUECIMENTO

A solução de ADTP foi utilizada como meio nutritivo, não seletivo, permitindo a recuperação das células lesadas. Os tubos de ensaio contendo o suabe com a amostra e a solução de ADTP foram retirados da caixa de isopor e incubados em estufa a +- 37°C durante 18 horas.

### 4.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR

Após etapa de pré enriquecimento, as amostras foram levadas ao laboratório de bioengenharia da UTFPR - Ponta Grossa e submetidas às seguintes etapas para a realização da PCR.

#### 4.3.1 Extração de DNA por lise térmica

Para a extração de DNA seguiu-se o protocolo descrito por Chapman *et al.* 2006 o qual utiliza a lise térmica, com ligeiras modificações de acordo com os procedimentos laboratoriais estabelecidos na UTFPR *Campus* Ponta Grossa.

Foi adicionado 1,5 mL da cultura a um microtubo, este foi centrifugado (centrifuga mikro 200 hettich zentrifugen) em 5000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado para obtenção do pellet, este foi homogeneizado com 1mL de água destilada autoclavada pura em vortex por 1 minuto.

O microtubo foi novamente centrifugado em 12000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi homogeneizado com 0,2mL de água destilada autoclavada pura em vortex por 1 minuto. O microtubo foi aquecido em banho seco (dryblock bs30) à 95°C durante 10 minutos, em seguida foi retirado e congelado à -20°C por 30 minutos e reaquecido à 65°C durante 1 minuto.

Após o aquecimento o microtubo foi centrifugado em 12000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante contendo DNA foi transferido para outro microtubo e mantido a -20°C até a realização da PCR.

#### 4.3.2 Reação de amplificação de DNA

A mistura de reação foi preparada sempre para conjuntos de amostras de DNA e para uma amostra do controle em branco (com água). A reação de amplificação foi realizada em um volume de 25 µL, contendo por amostra 15,1 µL de água ultrapura; 0,32 mM dNTP (bases nitrogenadas); 50 mM Buffer (tampão que

propicia o meio), 1,0  $\mu$ M de primer S+R, 0,75  $\mu$ M MgCl (cofator enzimático da *taq*), 1,5 *Taq* (enzima e sua unidade é de medida) e 3  $\mu$ L de DNA extraído ou de água autoclavada para a amostra em branco.

Galan et al. (1992), efetuaram a caracterização molecular de um dos genes do invasão de *Salmonella* e identificaram um *locus* genético, denominado *inv*, como o primeiro de um operon de genes arranjados na mesma unidade transcricional, que codificaria proteínas relacionadas com penetração celular, ligado com o potencial patogênico que a mesma detém.

A escolha dos *primers* considerou a especificidade para a identificação do gênero *Salmonella* sp. Os *primers InvA*, amplificam um fragmento de 457pb e são específicos para bactérias do gênero *Salmonella* (GALAN et al., 1992; STONE et al., 1994). A amplificação do DNA foi sintetizado com base na sequência apresentada na tabela 2, proposta por RAHN et al. (1992) .

PRIMERS	SEQUÊNCIA
1	5'- GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GCG CAA 3`
2	5'- TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3`

**Quadro 2 - Sequência de *primers* utilizados para amplificar o *invA*.**

**Fonte: Autoria própria**

O programa específico para amplificar os fragmentos de DNA foi realizado em termociclador Axigen 1000.nas seguintes condições: desnaturação inicial a 93°C por cinco minutos, 35 ciclos: 93°C por um minuto, 57 °C por trinta segundos e 72°C por um minuto e extensão final de 72°C por cinco minutos.

#### 4.3.3 Visualização do gel de agarose

Após o preparo do gel, foi misturado 5  $\mu$ L de TC (tampão de carregamento composto por Tris e EDTA, sacarose, azul de bromofenol e brometo de etídio) e 5  $\mu$ L da amostra, e então aplicados no gel. O gel preenchido foi colocado em cuba de eletroforese e adicionado solução TBE 1X até total submersão do gel.

A análise dos fragmentos amplificados de DNA na altura de pares de base de cada indicador foi executada por eletroforese durante 1 hora a 140 V em gel de agarose 2%. O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA Ladder 100pb.

O gel foi então corado em solução contendo brometo de etídio a  $\mu\text{L} / \text{mL}$ , durante 15 minutos.

A observação de fragmentos de DNA amplificados após a migração em eletroforese foi realizada em aparelho transiluminador e os resultados foram fotografados em sistema digital.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AJUSTES METODOLÓGICOS PARA AMPLIFICAÇÃO

Para adequação da técnica foi realizado um teste piloto com a amostra número três, neste teste foram utilizadas três diferentes concentrações de DNA, cada uma destas com seis diferentes temperaturas de hibridização (anelamento). As quantidades e as temperaturas utilizadas estão descritas no quadro 3.

Concentração	Temperatura (°C)					
DNA PURO	53,1	53,9	55,7	56,1	57,5	58,1
DILUIÇÃO 10X	53,1	53,9	55,7	56,1	57,5	58,1
DILUIÇÃO 20X	53,1	53,9	55,7	56,1	57,5	58,1

**Quadro 3 - Quantidades de DNA e temperaturas de hibridização utilizadas no teste piloto.**

**Fonte: Autoria própria**

Os resultados deste teste podem ser visualizados na Figura 3, a qual demonstra que a amplificação realizada com a diluição de 20X da amostra de DNA nº3 foi a que produziu a banda mais nítida. Outro fator determinado foi a temperatura, a qual foi mais eficiente quando utilizado 57,5°C. A condição selecionada foi eficiente, pois apresentou a banda amplificada do gene *invA*, que amplifica a 475 pares de bases (pb) como indicada nas bibliografias consultadas (RODRIGUES et al., 2012).



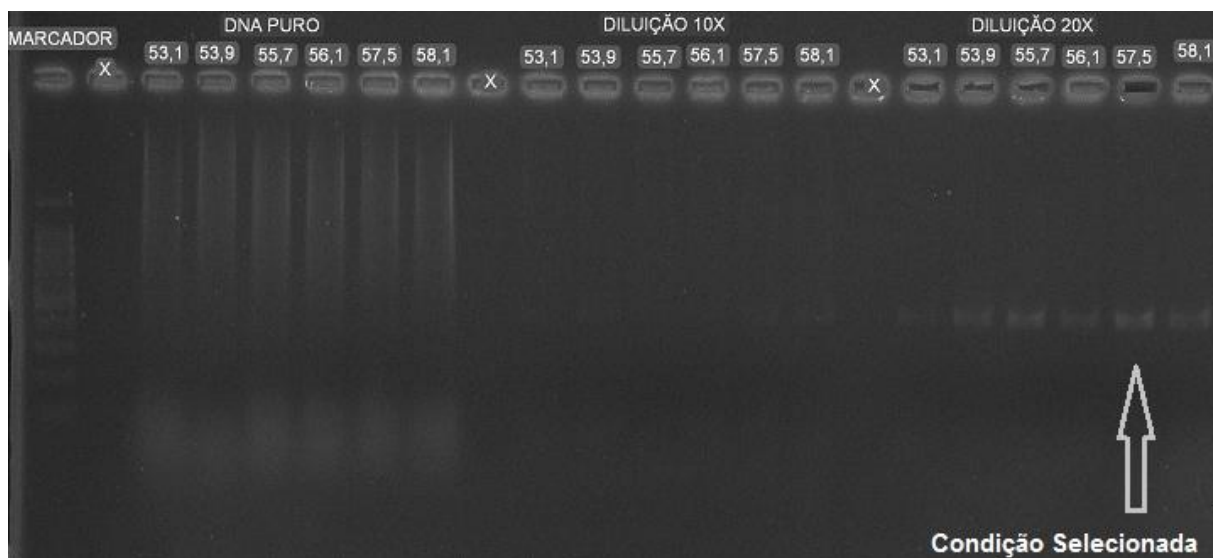


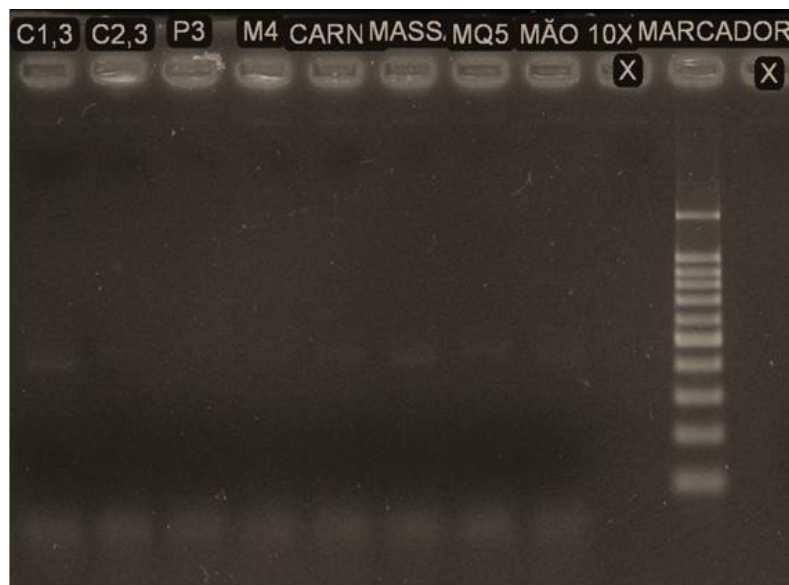
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 2% do teste piloto.

Fonte: Autor

Ano: 2012

### 5.1.2 Eletroforese da PCR

De posse destas condições realizou-se a análise molecular para as amostras de *Salmonella* sp. dos pontos coletados. Estes pontos foram coletados com as condições descritas no item 4.1 da metodologia. Onde o suabe permaneceu no meio ADTP durante 24 horas, o isolamento de DNA foi realizado por lise térmica. A figura 4 apresenta este padrão da amplificação de acordo com as condições de eletroforese.

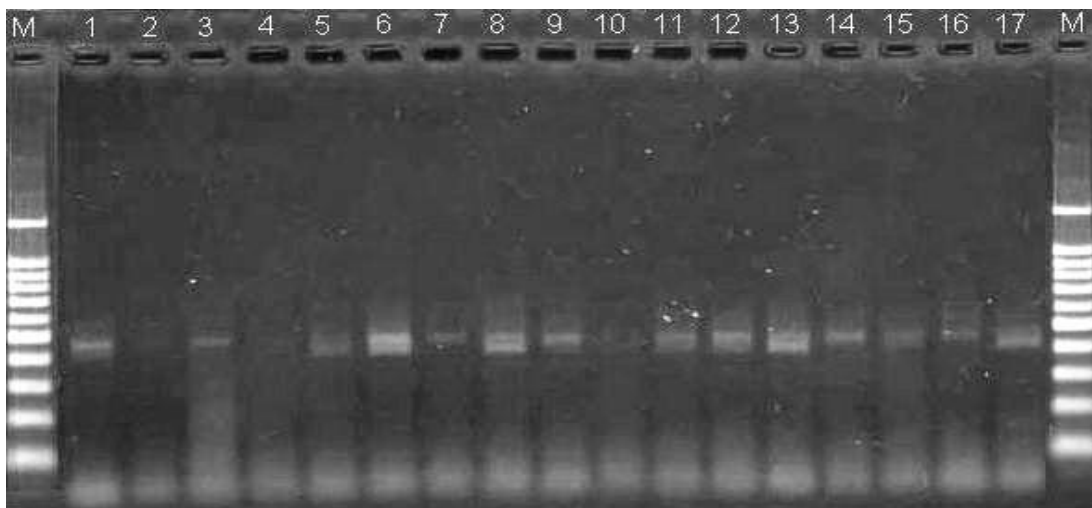


**Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos com DNA extraído dos pontos de coleta.**

**Fonte: Autor**

**Ano: 2012**

Ao visualizarmos a figura 4 nota-se que o padrão de bandas foi diferente entre as canaletas, o gene de *Salmonella* foi amplificado demonstrando a presença do microrganismo. Entretanto, este trabalho foi desenvolvido paralelamente nas condições de microbiologia convencional para atestar a veracidade dos dados produzidos (comunicação pessoal da mestranda Renata Samulak). A partir desta imagem e do cruzamento dos dados com a microbiologia convencional, verificou-se que além das condições da amplificação que precisam ser ajustadas, havia a necessidade da amplificação ser mais nítidas para que não houvesse dúvidas sobre possíveis falsos positivos. Para tanto foi realizada a Neste PCR (descrita no item 4.3.3), após este procedimento o padrão de bandas obtido foi nítido e de fácil visualização permitindo um diagnóstico preciso. A visualização da amplificação em gel de agarose utilizando *nested* PCR é demonstrada na figura 5.



**Figura 5 - Visualização da amplificação em gel de agarose utilizando *nested* PCR.**

**Fonte: Autor**

**Ano: 2012**

A amplificação produziu fragmentos de DNA com o tamanho esperado de 475 pb. em 16 dos 17 pontos amostrados nas amostras de DNA de *Salmonella sp.*

Com os resultados da amplificação da figura 5, organizou-se uma tabela da presença de *Salmonella sp.* nos pontos amostrados.

## 5.2 PRESENÇA DE *SALMONELLA SP.* EM PONTOS AMOSTRADOS

A frequência de ocorrência de *Salmonella spp.* foi de 94% para a o método da PCR. Esta porcentagem esta bem acima do encontrado por Gamarra (2007), Lima et al. (2004) e Matsubara (2005) que identificaram (pela MBC) respectivamente 9,3%; 11,7% e 5,42%.

Número dos pontos amostrados	PCR
1	+
2	-
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+
10	+
11	+
12	+
13	+
14	+
15	+
16	+
17	+
TOTAL	16 (94%)

**Quadro 4 - Presença de Salmonela nos pontos amostrados.**

**Fonte: Autoria própria**

O resultado da presença de *Salmonella spp* em carcaças suínas é variado, são registrados valores tão baixos como 1,4% (SWANEMBURG et al., 2001), até valores próximos de 13% (OOSTEROM et al., 1985) e mais elevados como 27% (KORSAK et al., 1998), 29% (EPLING et al., 1993) e 30% (BERENDS et al., 1997). Bessa et al. (2004) encontraram 55,66% de suínos positivos ao abate, entre 300 animais coletados em três frigoríficos sob Inspeção Federal do Rio Grande do Sul. Resultados próximos foram observados por Damman et al. (1999) nos Estados Unidos (67,6%).

Em estudo realizado por Castagna (2005), aonde foram comparados os métodos para diagnóstico de *Salmonella sp.*, PCR e microbiológico convencional, o primeiro obteve 21% mais resultados positivos que o segundo. Estes resultados corroboram os encontrados por Oliveira (2002), que ao realizar estudo similar comparando ambos os métodos para detecção em amostras de aves, me que o método de PCR detectou 128% mais amostras positivas do que o método de microbiologia convencional.

Possíveis explicações para este fato são: a) o meio de pré-enriquecimento utilizado, ADTP é nutritivo e não seletivo, isto significa que a recuperação de outras bactérias ocorreram simultaneamente com a da *Salmonella* sp., quando inoculadas no meio de crescimento para contagem aeróbica podem ter criado um ambiente competitivo desfavorável para o crescimento de *Salmonella* sp. e b) tem sido proposto que muitos patógenos bacterianos são capazes de entrar em um estado dormente (Dodd *et al.*, 1997), nesse estado, as células permanecem viáveis, mas não são cultiváveis, daí o termo viável mas não-cultivável (VNC).

Esse fenômeno foi demonstrado em *Salmonella* spp, por Colwell *et al.* demonstrou que vibriões, a princípio não cultiváveis, do intestino humano, recuperam sua habilidade de multiplicação. Este estado é assumido pelas bactérias devido a fatores extrínsecos como mudanças de temperatura, nível baixo de nutrientes, pressão osmótica, atividade de água e pH, tornando o meio ambiente desfavorável para o crescimento e multiplicação (CASTAGNA *et al.*, 2005).

A falha para detectar algumas amostras positivas de *Salmonella* pela microbiologia convencional pode ser relacionada ao fato de que outros microrganismos isolados na amostra produzam colônias que dissimulam as características das colônias de *Salmonella*, levando a resultados falso-negativos (BENNET, 1998). Pode também ser relacionada com a quantidade de *Salmonella* sp. presente na amostra. Em um estudo realizado por Castagna (2005), foi observado que uma baixa quantidade (2 cfu/g) de *Salmonella* sp. inoculada em 6 amostras de alimentos, o método de microbiologia convencional detectou como positivo 16%, enquanto o método de PCR detectou 100%.

A adição da etapa de pré-enriquecimento antes da realização da PCR aumenta a sensibilidade da mesma, o número de microrganismos de  $10^6$  a  $10^9$  cfu/mL, além de reduzir a influência negativa do complexo alimentar diluindo a amostra (HOORFAR, 1999). Vários autores concordam que esta etapa aumenta a sensibilidade da técnica elevando o número de células a um nível detectável facilitando a obtenção de resultados verdadeiros positivos (WANG; YEH, 2002; GROCI *et al.*, 2003; MYINT *et al.*, 2006).

Além dos ajustes da tecnologia para se elevar a qualidade sanitária, o desenvolvimento de técnicas rápidas, sensíveis e específicas são também necessárias, para a identificação e monitoramento da ocorrência de agentes de importância. A PCR é uma técnica útil nesse sentido, é aplicável nos procedimentos

de verificação em planos de APPCC e permite a análise de numerosas amostras ao mesmo tempo para investigar a ocorrência de patógenos (GROCI et al., 2003).

No ponto número 2, o resultado foi negativo para *Salmonella sp.*. Este ponto refere-se à região lombar do suíno número 1 logo após a etapa de depilação. O posterior resultado positivo relacionado à carcaça número um demonstra a existência de contaminação cruzada nas etapas seguintes, podendo ser oriundas de utensílios utilizados no processo de evisceração como as facas, a serra, as mãos dos manipuladores e o ar. Reforçando o argumento de Shwartz (2000) onde o conteúdo intestinal pode ser fonte importante de contaminação cruzada das carcaças a presença de *Salmonella sp.* em animais abatidos pode favorecer este risco.

O estudo realizado por Elias & Madrona (2008), em uma indústria produtora de embutidos cárneos, analisando diferentes pontos do processo após a sua higienização, constatou que equipamentos que possuem contato direto com as matérias-primas e processamento apresentavam resíduos de massa e sujidades visíveis, indicando uma sanitização ineficaz, contribuindo para a contaminação cruzada no processo.

Algumas diferenças de resultados observadas nesta pesquisa quando comparadas com a literatura, em relação às variações da contaminação em diversos segmentos do processo de abate de suínos podem ser justificadas pela variação das condições de higiene operacional e pessoal, de equipamentos e das instalações vigentes em cada estabelecimento, de acordo com a região geográfica, quantidade de amostras analisadas, pesquisas em diferentes regiões da carcaça, utilização de metodologias diferentes para isolamento e diagnóstico do agente, revelando a complexidade das atividades de abate (GAMARRA, 2007 & MATSUBARA, 2005). Por isso, diferentes etapas podem se constituir em variados PCC's, em função da estrutura de abate de cada estabelecimento (GAMARRA, 2007).

### 5.3 CONSEQUÊNCIAS DA PRESENÇA DE *Salmonella sp.* NO PROCESSO DE ABATE E FÁBRICA DE EMBUTIDOS.

No passado, os produtos de origem suína estiveram menos freqüentemente implicados como fonte de surtos de toxinfecção alimentar causados por *Salmonella*

em humanos. Entretanto, após um surto ocorrido na Dinamarca, onde a fonte pode ser traçada até produtos suínos (Wegener & Bager 1997), a situação mundial tem se modificado. A partir da Dinamarca, foi iniciado um programa de controle que passou a ser adotado pela maioria dos países produtores e exportadores de produtos suínos (BESSA *et al.*, 2004).

No Brasil, a ocorrência de *Salmonella* em suínos sadios já havia sido relatada por Neiva (1946) e Lazaro *et al.* (1997). No Rio Grande do Sul, Weiss *et al.* (1999) e Michael (2000) isolaram *Salmonella* sp em granjas de terminação de suínos; entretanto não determinaram a prevalência de animais positivos nos rebanhos (BESSA *et al.*, 2004).

Os resultados positivos para *Salmonella* sp. obtidos desde início do processo de abate comprovam o argumento de Teixeira (2006) de que a presença do agente na carcaça indica risco de contaminação do consumidor e pode estar sendo ocasionada por amostras do microrganismo presentes no ambiente.

A presença de *Salmonella* sp. em gânglios linfáticos que normalmente permanecem na carcaça (COSTA *et al.* 1972) pode ser um dos fatores responsáveis pela presença do agente no produto final.

Thorberg & Engvall (2001) relataram que os processos particularmente envolvidos no risco de contaminação por *Salmonella* sp. no abate de suínos são a evisceração e a toailete, mas o escaldamento e a divisão da carcaça também podem introduzir microrganismos que resultam em uma maior contaminação ao fim da linha do abate (GAMARRA, 2007).

O alto índice de resultados positivos para *Salmonella* sp. representa um perigo potencial à saúde e são de grande interesse das empresas, pois um lote contendo toxinas deste microrganismo pode ser liberado e causar um surto de infecção, podendo levar os consumidores a estado enfermo ou até a óbito e se o fato for rastreado até a empresa pode causar sérios prejuízos ou até seu fechamento.

A detecção de *Salmonella* sp. em diferentes pontos no abate e no embutimento final demonstram uma necessidade de melhoria no processo de produção atualmente utilizado.





## 6 CONCLUSÃO

A PCR é um método que pode ser utilizado como diagnóstico de *Salmonella sp.* em carne suína, entretanto precisa de vários ajustes para ser eficiente.

O número de pontos contaminados por *Salmonella spp* no estabelecimento estudado é considerado alto (94%), apresentando um risco para o mesmo e para os consumidores.

O alto índice de resultados fortalece a utilização da PCR como método de detecção de *Salmonella sp.* em carne suína, indicando a sensibilidade e especificidade da técnica.

Com os resultados deste trabalho foi comprovada a necessidade de melhoria no processo de abate e embutimento suíno atualmente utilizado, evitando a contaminação cruzada e adotando medidas para que se consiga reduzir ao máximo a contaminação no produto final.

É pertinente o desenvolvimento de estudos como este para adotar-se a técnica da PCR como método oficial de diagnóstico, pois esta permite a análise de numerosas amostras simultaneamente com tempo de obtenção de resultado inferior ao método oficial.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia S.A., 1995. 464p.
- BENNETT, A.R.; Greenwood, D.; Tenant, C.; Banks, J.G.; Betts, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Lett. Appl. Microbiol.**, 26, 437-441, 1998.
- BERENDS, B. R.; VAN KNAPEN, F.; SNIJDERS, J. M. A.; MOSSEL, D. A. A. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 199-206, 1997.
- BORCH, E; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 30(1/2), p. 9-25, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visalegis. **Resolução RDC n. 13/2001**. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n.62**. 2003.
- CASTAGNA, S. M. F. *et al.* Detection of *salmonella* sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. **Brazilian Journal of Microbiology** 36, p. 373-377, 2005.
- CHAPMAN, P.A. *et al.* Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology** 68, p. 11-20, 2001.
- CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Cadeia produtiva de suínos e disseminação de *Salmonella***. Ano 30, nº31. 2004.
- DAROT, Moacir Roberto. Alimentos Orgânicos: um guia para o consumidor consciente. 2.ed. rev. Ampl. – Londrina: **IAPAR**, p. 36, 2007.
- DOOD, C.E.R., SHARMAN, R.L., BLOOMFIELD, S.R., BOOTH, I.R. & STEWART, G.S.A.B. Inimical processes: bacterial self-destruction and sub-lethal injury. **Trends Food Science Technology**, 2007.
- D'AOUST, J. *Salmonella* species. In: DOYLE M.P.; BEUCHAT L. R.; MONTVILLE T, **International Journal of Food Microbiology**, Washington, ASM Press, Cap 8, p. 129- 158, 1997.

ELIAS, A.H.; MADRONA, G.S. Avaliação de uma indústria produtora de embutidos cárneos quanto à higiene e legislação vigente no Brasil. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v.02, n.02: p. 71-81. 2008.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Artmed Editora, 2002, p. 65.

FREITAS, E.I.; LEMOS, A.A.; MARIN, V.A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1073-1083, 2006.

GALAN, J.E.; GINOCCHIO, C.; COSTELAS, D.P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *InvA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. **Journal Bacteriol.**, v.174, p.4338-4349, 1992.

GARCIA, B. M. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Ed Acribia, 1982, 375 p.

GAMARRA, R. M. **Identificação de pontos críticos de *Salmonella spp.* no abate de suínos**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria. UFSM, RS, 2007.

GILL, C. O. Current and emerging approaches to assuring the hygienic condition of red meats. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1-13, 1995.

GILL, C. O.; MCGINNIS, J. C. Contamination of beef trimmings with *Escherichia coli* during a carcass breaking process. In **Food Research International**, v. 33 , p. 125–130, 2000. Disponível em: < [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)>. Acesso em: 03/06/12.

HOORFAR, J. Baggesen, D.L.; Porting, P.H. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. **J. Microbiol. Methods.**, 35, 7-84, 1999.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6. ed. Maryland: Aspen, 2000, 679 p.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Tercera edición. Zaragoza: Acribia, 1994, p.651- 668.

JURAN, P. G. A evolução do conceito de qualidade: dos bens manufaturados aos serviços de informação. **Cadernos Bad 2**, p. 7-17, 2004.

KORSAK, N.; DAUBE, G.; GHAFIR, Y.; CHAHED, A.; JOLLY, S.; VINDEVOGEL, H. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 5, p. 535-541, 1998.

LE MINOR, L.; RICHARD, C. Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérovactéries. **Paris: Institut Pasteur, Commission des laboratoires de reference et expertise**, 1993, p. 27-54.

MAFU, A. A.; HIGGINS, R.; NADEAU, M.; COUSINEAU, G. The incidence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* in swine carcasses and the slaughter environment. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 9, p. 642-645, 1989.

MATSUBARA, Esther Naomi. **Condição higiênico-sanitária de medias-carcaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise da utilização de Lista de Verificação para avaliar boas práticas no abate de suínos**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

MATTICK, K. L.; BAILEY, R. A.; JORGENSEN, F.; HUMPHREY, T. J. The prevalence and number of *Salmonella* in sausages and their destruction by frying, grilling or barbecuing. **Journal of Applied Microbiology**, Danvers, v. 93, n. 4, p. 541-547, 2002.

MIELE, Marcelo. MACHADO, Jurandi Soares. **Especial: Os caminhos da suinocultura**. 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Food safety and foodborne illness. Fact Sheet, n. 237, Revised January 2002**. Disponível em: <<http://www.who.int/inffs/en/fact237.html>>. Acesso em: 1 mar. 2010

OLIVEIRA, S. D. et al. Detection and identification of salmonellas from poultry by PCR. **Vet. Microbiol.**, 87, 25-35, 2002.

PEARCE, R. A.; BOLTON, D. J.; SHERIDAN, J. J.; McDOWELL, D. A.; BLAIR, I. S.; HARRINGTON, D. Studies to determine the critical control points systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 331-339, 2004.

PELOSO, João Vicente. Tratamento pós-abate das carcaças e os desvios de qualidade na transformação músculo-carne em suínos. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento – MAPA. 1ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína**. Santa Catarina, p. 100 – 110, 2000.

RODRIGUES, M. X.; GONÇALVES, A.; FELKL, G.S.; SAMULAK, R.L.; BITTENCOURT, J.V.M. Diagnóstico molecular para detecção de patógenos alimentares em embutidos. **Congresso Agropecuário Industrial e Tecnológico do Paraná**. 2012

SANTOS, A. F.; VIZEU, S. M.; DESTRO, M. T. Determinação da dose de radiação gama para reduzir a população de *Salmonella sp* em carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.23, n.2, maio/ ago, 2003. Disponível em: <[www.http://scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101061200300020001&lng=pt&nrm-isso](http://scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101061200300020001&lng=pt&nrm-isso)>. Acesso em: 06/05/2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3ª Ed. Varela, 2007.

SOLANGE. R. T. **Detecção de *Salmonella spp.* Em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de suínos no momento do abate**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo. São Paulo, 2006.

SOUSA, C. L. *et al.* Pesquisa de *Salmonella* em cortes cárneo e avaliação da temperatura de armazenamento de setor de carnes, em supermercado da cidade de Belém, PA. **Higiene Alimentar**. V.22, p.73-78, 2008.

STEVENSON, Peter. Questões de bem-estar animal na criação intensiva de suínos na União Européia. **1ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína**. Santa Catarina, 2000.

STEVENSON, Peter. Questões de bem-estar animal na criação intensiva de suínos na União Européia. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento – MAPA. 1ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína**. Santa Catarina, p. 4 – 10, 2000.

SHWARTZ, K.J. 2000. Salmonellosis, p.535-551. In: Straw B.E., D’Allaire S., Mengeling W.L. & Taylor D.J(ed). **Diseases of Swine**. 8th ed. Iowa State University, Ames.

TOMPKIN, R.B. The use of HACCP in the production of meat and poultry products. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 795-803, 1990.

VIEIRA, D. P. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. 2002