****

# VALIDAÇÃO POR MICROBIOLOGIA PREDITIVA DO PROCEDIMENTO SANITÁRIO OPERACIONAL DA LAVAGEM DA CARCAÇA DE BOVINOS PARA GARANTIA DA QUALIDADE E SEGURANÇA AO CONSUMO

# DIAS, B.P.1; SILVA, J.P.C.1; NASCIMENTO, A.L.2; RIBEIRO JÚNIOR, J.C.3; ALMEIDA, K.S.4

1Monitora Bolsista do Programa Alvorecer, Graduanda em Medicina Veterinária, UFNT.

2Bolsista de Iniciação Científica, Graduanda em Medicina Veterinária da UFNT.

3Docente do curso de Medicina Veterinária da UFNT.

4Coordenadora do projeto do curso de Medicina Veterinária no Programa Alvorecer.

**Área Temática: CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

# RESUMO

Carcaças de bovinos foram avaliadas antes e após a etapa de lavagem para determinar o efeito desse procedimento na qualidade e segurança microbiológica. Foi realizada a quantificação de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, pesquisa qualitativa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, de fatores de virulência de estirpes diarreiogênicas (EPEC, ETEC, EIEC, EAEC e STEC) de *E. coli* e pesquisa de genes que codificam a produção de enterotoxinas estafilocócicas A a E (*se*A a *se*E), toxina do choque tóxico (TSST-1) e esfoliativas A e B de *S. aureus*. Observou-se que após a lavagem houve um aumento, não significativo, das contagens dos microrganismos, exceto de enterobactérias e uma disceminação da contaminação nas carcaças. Foi possível auxiliar a indústria produtora de proteína animal para validação do procedimento sanitário operacional da lavagem das carcaças, determinando que não houve aumento significativo nas contagens de micro-organismos e que é possível aumentar a disseminação dos patógenos na superfície das carcaças, sendo necessário um maior controle em outros pontos críticos anteriores à lavagem que podem comprometer a sua qualidade e segurança.

**Palavras-chave:** contaminação; frigoríficos; patógenos**;** PSOs.

# INTRODUÇÃO

O processo do abate de animais deve ser realizado de forma higiênica para evitar a contaminação das carcaças, principalmente microbiológica. A contaminação é majoritariamente relacionada com procedimentos de abate realizados de forma incorreta e que permitem a inclusão de contaminantes oriundos do couro e trato gastrointestinal, principalmente, uma vez que o músculo pode ser considerado estéril (Zweifel, Capek and Stephan, 2014).

 Para evitar a inclusão de patógenos, deteriorantes e outros micro-organismos, diversos procedimentos sanitários operacionais (PSOs) são realizados pelos abatedouros frigoríficos, previstos, monitorados e verificados nos seus programas de autocontrole. Dentro dos PSOs, cada operação deve ser realizada de forma padronizada e individualizada por carcaça, executando procedimentos que podem eliminar ou minimizar a contaminação. A identificação de fases específicas nos abatedouros frigoríficos que aumentam ou diminuem a contaminação microbiana da carcaça também é de importância central para a implementação de sistemas baseados em análise de perigos e pontos críticos de controle (Zweifel, Capek and Stephan, 2014).

Após a inspeção final de carcaças, de todas as espécies, é realizada a lavagem final para a remoção, principalmente, de sangue que pode ficar aderido. Em condições brasileiras de obtenção, essa lavagem constitui um PSO que deve ser executado com água sob pressão, no sentido do membro posterior para o anterior, com água clorada (até 5 ppm), respeitando pelo menos 30 segundos de gotejamento antes da entrada das carcaças nas câmaras frias.

 O estudo de Zweifel, Capek e Stephan (2014) verificou que as contagens microbiológicas da carcaça de bovinos podem aumentar ou diminuir, dependendo do estabelecimento e operações que são realizadas intrinsecamente nas instalações. Dessa forma, são necessários estudos localizados para determinar o efeito da lavagem, validando procedimentos sanitários operacionais que podem implicar na maior sanidade da carne para o consumo assim como na vida útil.

 Considerando o supracitado, o presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito de um PSO de lavagem de carcaça de bovinos na sua qualidade e segurança microbiológica em bovinos abatidos sob inspeção federal na região tropical do Brasil, determinando a ocorrência e caracterizando fatores de virulência de potenciais perigos biológicos que podem estar relacionados à sanidade da carne para o consumo.

# METODOLOGIA

Avaliou-se 30 carcaças de bovinos abatidos em 12 de setembro de 2023 em um frigorífico regularmente em operação sob regime de inspeção federal no município de Xinguara, Pará. Os animais foram abatidos em operação regular do estabelecimento e a coleta de amostras realizada imediatamente após o término da inspeção final, sendo consideradas aptas para consumo. A coleta foi executada por monitores bolsistas do Programa Alvorecer do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT).

 As carcaças foram avaliadas antes e após a etapa de lavagem. Foram amostrados 100 cm2, delimitado por molde 10 x 10cm estéril, da região entre o peito e o membro dianteiro e realizada a esfregadura com auxílio de esponja estéril (Laborclin, Brasil) hidratada com 10 mL de água peptonada tamponada (Acumedia), de modo que cada mL da solução representava 10 cm2. Logo após o procedimento sanitário operacional, ou seja, da lavagem com água sob pressão de 3 atmosfera (atm), 5 partes por milhão (ppm) de cloro e em temperatura ambiente, realizou-se a coleta no mesmo local amostrado anteriormente. Após a lavagem, as carcaças passaram por gotejamento de aproximadamente 3 min para depois serem novamente amostradas, antes da entrada na câmara fria, utilizando o mesmo procedimento de coleta.

 As amostras foram mantidas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFNT, em Araguaína, Tocantins, onde foram processadas. Homogenizou as amostras e realizoua diluição decimal seriada em solução salina (0,85%) peptonada (0,001%), até a concentração de 10-4.

 Quantificou os micro-organismos indicadores utilizando o método Compact Dry (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japão). Realizou-se a contagem total (Compact Dry TC), de enterobactérias (ETB), coliformes totais e E. coli (TC) e *S. aureus* (XSA), conforme as recomendações do fabricante. As placas foram incubadas de 24 a 48 horas à 35 ±1ºC para as contagens e os valores expressos em unidades formadoras de colônias por cm2 (UFC/cm2). Considerando as diluições utilizadas, determinou-se, portanto, o intervalo de detecção de 0.1 (1 mL correspondendo a 10 cm2) até 105 UFC/cm2.

 A pesquisa qualitativa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* realizada conforme os métodos *International Organization for Standardization* (ISO) ISO 6579:2002/Amd 1:2007 e 11290-1:1996/Amd 1:2004, repectivamente. Ambos os métodos foram modificados para inclusão da confirmação em PCR gênero e espécie-específica apresentado na Tabela 1.

 Todos os isolados de *E. coli* e *S. aureus* das placas utilizadas nas contagens foram recuperados em caldo BHI (Acumedia) por 24h à 35±1ºC e submetidos à extração de gDNA conforme Ribeiro Júnior et al. (2016).

 Os isolados de *E. coli* submetidos à dois ensaios de PCR multiplex para detecção de fatores de virulência que identificam estirpes diarreiogênicas, conforme a Tabela 1. Pesquisadas *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), produtora de toxina shiga (STEC). A pesquisa de *E. coli* enterohemorragica (EHEC) foi realizada pela presença simultânea de genes que caracterizam EPEC (*eae*A) e STEC (*stx*1 e/ou 2).

 Todos os isolados de *S. aureus* foram submetidos à pesquisa de genes que codificam a produção de enterotoxinas estafilocócicas A, D, E, toxina do choque tóxico (TSST-1), toxinas esfoliativas A e B, conforme metodologia apresentada na Tabela 1.

Realizaram-se todos os ensaios de PCR (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. aureus*) com a seguinte constituição: ≈ 50 ng de DNA molde, 100 nM de cada dNTP, 2,5 μL de tampão 10x, 75 mmol/L de MgCl2, 20 pmol/L de cada *primer*, 2.5 U de *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen, CA, USA) e água ultrapura para completar o volume final de 25 μL. As condições de amplificação para cada ensaio estão descritas nos protocolos referenciados na Tabela 1. Os produtos de PCR visualizados sob luz ultravioleta após a coloração dos géis em brometo de etídio (20mg/L). Cada ensaio foi validado com controles positivos e negativos em cada reação.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens médias (UFC/cm2) dos grupos de micro-organismos avaliados estão na tabela 2. Observou-se que as quantificações de coliformes totais, *E. coli*, contagem total e *S. aureus* aumentaram após a lavagem das carcaças. O único grupo que apresentou redução das contagens após a lavagem foi de enterobactérias. As variações nas contagens, no entanto, não apresentaram diferenças significativas. As contagens foram superiores mais expressivamente para *S. aureus*, nos quais os valores absolutos médios passaram de 0,54 para 33,7 UFC/cm2 após a lavagem, representando um aumento de 62 vezes a contagem inicial.

 O aumento significativo de aeróbios mesófilos após a lavagem das carcaças foi verificado por Zweifel, Capek & Stephan (2014) em um dos dois frigoríficos avaliados, não só na região do peito como a avaliada pelo presente estudo, mas também em outras três partes da carcaça. O mesmo estudo, no entanto, não evidenciou o aumento significativo de enterobactérias, verificando inclusive a redução ou eliminação.

**Tabela 2 –** Contagens médias (desvio padrão) de grupos de micro-organismos indicadores na carcaça de bovinos antes e após a lavagem.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | Enterobactérias | Coliformes totais | *Escherichia coli* | Aeróbios mesófilos | *Staphylococcus aureus* |
| Antes (UFC/cm2) | Média | 58a | 4.26a | 0.36a | 336.8a | 0.54a |
| Mediana | 27 | 3 | 0.3 | 96 | 0.5 |
| Desvio padrão | 91.31 | 5.17 | 0.31 | 496.75 | 0.26 |
| Depois (UFC/cm2) | Média | 41.2a | 11.36a | 2.7a | 941.2a | 33.7b |
| Mediana | 26 | 10 | 0.95 | 640 | 6 |
| Desvio padrão | 38.41 | 11.31 | 3.6 | 909.16 | 59.84 |
| **p-valor\*** | 0.42 | 0.14 | 0.10 | 0.13 | 0.007 |

\*Valor obtido no teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade.

 Diversos estudos disponíveis na literatura justificam a utilização de diferentes condições para a lavagem das carcaças posteriormente ao abate, como lavagem com ácido lático (BIOHAZ, 2011), ácido acético (CEP et al., 2018), água quente e vapor à vácuo (Saba, R. Z., Bürger, K. P., Rossi Junior, O. D., 2010), entre outros. No entanto, em condições brasileiras de produção, em que qualquer contaminação visual de origem ambiental e/ou gastrointestinal deve ser removida e condenada da carcaça durante a inspeção, foi verificada baixa contaminação das carcaças, não sendo necessário nenhum tratamento adicional para o atendimento de padrões de qualidade.

Para *L. monocytogenes*, recuperados 32 isolados sugestivos das carcaças anteriormente à lavagem e 63 depois, totalizando 95 isolados submetidos à PCR espécie-específica que não identificou nenhum isolado positivo.

Sugestivos de *Salmonella* spp. em placas, recuperados 40 e 47 isolados das carcaças antes e depois da lavagem, respectivamente. Desses 87 isolados, somente 1 (1.15%) foi positivo na pesquisa do gene *inv*A. Esse isolado positivo foi recuperado de uma carcaça após o procedimento de lavagem.

A recuperação de isolados de *E. coli* antes da lavagem foi menor, proporcionalmente às menores contagens, sendo que das 30 carcaças avaliadas obteve-se somente 10 isolados, todos de carcaças diferentes. Desses isolados, nenhum foi positivo para os genes de virulência avaliados. Após a lavagem, no entanto, 42 isolados recuperados, destes identificou-se STEC (2 isolados, 1 positivo para os dois genes – *stx*1 e *stx*2; e, outro positivo para *stx*1, EPEC (1), ETEC (1 – ST gene).

 Antes da lavagem, recuperou-se 24 isolados de *S. aureus*, dos quais 3 (12,5%) eram positivos para o gene que codifica a enterotoxina estafilócica D (*seD*) e 2 (8,34%) para TSST-1. Após a lavagem das carcaças, 41 isolados e identificados somente 3 (7,32%) positivos para o gene *seD*.

Os isolados positivos para o gene *seD* foram provenientes de duas carcaças, sendo as mesmas positivas antes e após a etapa de lavagem, dessa forma, não observou qualquer efeito da lavagem na ocorrência do patógeno com esse potencial toxigênico.

Ao contrário, os isolados de *S. aureus* positivos para o gene *tst* das carcaças antes da lavagem não recuperou-se após a lavagem. Esses resultados observados, no entanto, não são suficientes para a afirmar que a lavagem das carcaças nas condições em que foram executadas podem reduzir o risco da ocorrência de TSST-1, uma vez que isolados com potencial toxigênico permaneceram detectáveis após a lavagem.

As altas contagens, após a lavagem, podem estar relacionadas à distribuição da contaminação e ao escorrimento da água para a região peitoral pelas carcaças estarem penduradas pelo membro posterior. Acompanhando as contagens, a ocorrência de enteropatógenos também aumentou após a lavagem das carcaças.

# CONCLUSÕES

#  Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a lavagem não teve efeito significativo para redução das contagens. Apesar do aumento nas contagens de forma não significativa, após a lavagem, possível que haja maior disseminação dos patógenos na carcaça. Dessa forma, medidas higiênico-sanitárias devem ser controladas durante todo o processo para minimizar o risco da ocorrência de perigos à saúde pública.

# FINANCIAMENTOS

#  A execução desse projeto contou com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Tocantins (FAPT – Edital de Pesquisa Agropecuária) e da Universidade Federal do Norte do Tocantins (bolsas – Programa Alvorecer).

# REFERÊNCIAS

EFSA PANEL ON FOOD CONTACT MATERIALS, ENZYMES AND PROCESSING AIDS (CEP) et al. Evaluation of the safety and efficacy of the organic acids lactic and acetic acids to reduce microbiological surface contamination on pork carcasses and pork cuts. **Efsa Journal**, v. 16, n. 12, p. e05482, 2018.

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. **EFSA Journal**, v. 9, n. 7, p. 2317, 2011.

ISO, ISO. 11290-1/Amd 1—Modification of the Isolation Media and the Haemolysis Test, and Inclusion of Precision Data. **Geneva: ISO**, 2004.

ISO, ISO. 6579: 2002/Amd 1: 2007 Detection of Salmonella spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage, amendment 1, annex D. **Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of Salmonella spp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland**, 2007.

SABA, Rachel Zoccal; BÜRGER, Karina Paes; ROSSI JUNIOR, Oswaldo Durival. Pressão e temperatura da água de lavagem na população microbiana da superfície de carcaças bovinas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1987-1992, 2010.

ZWEIFEL, Claudio; CAPEK, Michel; STEPHAN, Roger. Microbiological contamination of cattle carcasses at different stages of slaughter in two abattoirs. **Meat Science**, v. 98, n. 2, p. 198-202, 2014.