

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Gustavo Martins Felix Silva

**VIRULÊNCIA DE *Salmonella* spp. ISOLADAS DE CARCAÇAS DE RÃ-TOURO
SUBMETIDAS À DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM PRÉ-ABATE**

Uberlândia - MG
2017

Gustavo Martins Felix Silva

**VIRULÊNCIA DE *Salmonella* spp. ISOLADAS DE CARCAÇAS DE RÃ-TOURO
SUBMETIDAS À DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM PRÉ-ABATE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a coordenação do curso graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Coutinho
Cossi

Uberlândia - MG
2017

GUSTAVO MARTINS FELIX SILVA

**VIRULÊNCIA DE *Salmonella* spp. ISOLADAS DE CARCAÇAS DE RÃ-TOURO
SUBMETIDAS À DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM PRÉ-ABATE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a coordenação do curso graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Médico Veterinário.

Uberlândia, 21 de Dezembro de 2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcus Vinícius Coutinho Cossi
Universidade Federal de Uberlândia

Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi
Universidade Federal de Uberlândia

Dr^a. Eliane Mendonça Pereira
Universidade Federal de Uberlândia

Uberlândia-MG

2017

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, por me guiar e me dar forças para continuar a caminhar nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai Renato e à minha mãe Noraide, por todo apoio, amor, conselho, confiança, abraço de conforto e compreensão nos momentos de incertezas e inseguranças, à minha irmã Islaine pelo apoio, carinho e ajuda nas horas do sufoco e ao Pedro Antônio que acabou de nascer, mas já enche nossas vidas de alegria.

À minha irmã do coração Keila, por me apoiar e sempre ter um abraço que conforta nos momentos mais difíceis.

Ao grupo PET Medicina Veterinária em especial ao Leonardo, Rafaela, Vanessa, Karina, Roger, Amanda e Letícia que se tornaram a minha família por dois anos e meio de graduação, lugar onde adquiri grandes irmãos que levarei para toda minha vida. É aquele ditado uma vez petiano sempre petiano!

Aos meus amigos Fellipe, Ana Paula, Ana Luíza, Isadora, Gleysi, Stéfany, Rodrigo e Juliana que fizeram com que a graduação se tornasse mais leve, compartilhando momentos de alegrias e de tristeza.

Ao meu orientador e tutor Prof. Dr^o Marcus Vinícius Coutinho Cossi, por todo aprendizado repassado, paciência nos momentos difíceis, pela confiança e pela sua motivação diária dentro do grupo.

À Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi e à Dr^a Eliane Mendonça Pereira por participarem da banca examinadora.

À toda equipe do LABIO, em especial o Phelipe pelos ensinamentos e paciência durante toda execução do trabalho.

Resumo: A carne de rã possui sabor suave (variando entre a carne de frango e peixe), e todos os seus benefícios nutricionais têm atraído uma gama de consumidores na busca de uma alimentação mais saudável. Entrelaçado a isso a carne de rã se torna uma alternativa para diversas pessoas que buscam um alimento balanceado nutritivo e de baixa caloria. Entretanto obter um produto de qualidade é dificultado por uma ausência na padronização durante as etapas de abate e processamento da carne de rã. Não há na legislação um tempo de jejum pré-abate para rãs, portanto um jejum inadequado pode levar a contaminação microbiológica da carcaça, principalmente por agentes patogênicos como a *Salmonella* spp. O presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar genotipicamente *Salmonella* spp. em carcaças de rãs-touro submetidos à diferentes períodos de jejum pré-abate (0, 24, 48 e 72 horas), a fim de estabelecer um período de jejum ideal. Foram utilizadas 68 rãs com idade entre 6 e 10 meses e com média de peso ao abate de aproximadamente 355 gramas. As amostras biológicas foram obtidas por enxague superficial em duas etapas: após o abate do animal (A); e o segundo ponto após a toailete final e imediatamente antes da embalagem primária (B). No laboratório, as amostras foram submetidas à identificação de *Salmonella* spp. pela metodologia convencional e confirmadas por PCR (gene *ompC*). Das 68 amostras analisadas para a presença de *Salmonella* spp., (5,88%) foram positivas. De um total de quatro amostras três foram na etapa B, todas entre 0 e 24 horas de jejum. Todos os isolados apresentaram um mesmo perfil de virulência, sendo todos positivos para *lfpA*, *agfA* e *invA* e negativos para o gene *sefA*.

Palavras-chave: *Lithobates catesbeianus*. PCR. Microbiologia. Contaminação.

Abstract: Frog meat has a mild taste (ranging from chicken meat to fish) and all its nutritional benefits with an average of consumers looking for a healthier diet. Interlaced with this is a frog's meat becomes an alternative for several people seeking a nutritious and low calorie balanced food. However obtain an product of quality and difficulty by an absence in standardization during the stages of slaughter and processing of frog meat. There is no pre-slaughter fasting legislation for frogs, since fasting inappropriate can compromise the microbiological contamination of the carcass, mainly by pathogens such as *Salmonella* spp. The present work aimed to identify and characterize genotypically *Salmonella* spp. (0, 24, 48 and 72 hours), in order to establish an ideal fasting period. A total of 68 frogs were used between 6 and 10 months and mean weight at slaughter of approximately 355 grams. The biological samples were obtained by superficial rinsing in two stages: after the slaughter of the animal (A); and the second point after the final toilet and immediately before the primary packaging (B). In the laboratory, the samples were submitted to identification of *Salmonella* spp. by conventional methodology and confirmed by PCR (*ompC* gene). Of the 68 samples analyzed for the presence of *Salmonella* spp., (5.88%) were positive. Of a total of four samples three were in step B, all between 0 and 24 hours of fasting. All isolates presented the same virulence profile, all of which were positive for *lfpA*, *agfA* and *invA* and negative for the *sefA* gene.

Key words: *Lithobates catesbeianus*. PCR. Microbiology. Contamination.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Histórico da ricultura e importância econômica para o Brasil.....	10
2.2. Benefícios da carne de rã para a saúde dos consumidores	11
2.3. Abate e processamento de rã	13
2.4. <i>Salmonella</i> spp e sua importância na saúde pública	13
2.5. Fatores de virulência em <i>Salmonella</i> spp.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Local de coleta.....	18
3.2. Caracterização dos grupos de animais e pontos de abate.....	18
3.3. Coletas das amostras	19
3.4. Isolamento de <i>Salmonella</i> spp	19
4. Pesquisa por genes de virulência	21
5. Resultados e Discussão	22
6. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A criação comercial de rãs em cativeiro denomina-se ranicultura, é uma atividade zootécnica que vem se estabelecendo no Brasil assim como em outros países. A principal espécie utilizada é a *Lithobates catesbeianus*, conhecida popularmente como rã-touro (FERREIRA, FRANÇA, DIA, 2009). Diferentemente de outros países que desenvolvem a caça ou maneiras extensivas do cultivo de rã, o Brasil buscou desenvolver tecnologia da criação em cativeiro se tornando um dos expoentes mundiais nas técnicas de criação intensiva (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013).

O crescimento da ranicultura brasileira ocorreu de maneira rápida nas últimas décadas graças a evoluções tecnológicas e especialmente devido ao aperfeiçoamento de instalações e técnicas de manejo (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013). A partir de então a criação de rãs têm se firmado como uma atividade viável e com grande potencial de desenvolvimento (CASALI; MOURA; LIMA, 2005).

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), no Brasil os anfíbios que são usados na alimentação humana são classificados como pescados. De acordo com o regulamento, para que se garanta a qualidade dos produtos ofertados, a fiscalização deve ser realizada em caráter permanente, e diferentemente dos peixes, os anfíbios devem passar também pela inspeção *ante-mortem* (BRASIL, 2017).

O abate é um dos processos na cadeia produtiva que pode afetar a qualidade microbiológica da carne, em especial no abate de rãs, já que não existe uma padronização dos parâmetros para essa espécie, sendo utilizadas adaptações do método de abate de outros animais (BRASIL, 1998). Um exemplo é o jejum pré-abate de rãs, em que é utilizado um período de 24 horas, entretanto a falta de um parâmetro definido e específico pode comprometer a qualidade final do produto (LÓPEZ-LUNA et al., 2013; NATES et al., 2014).

Tempos de jejum prolongados podem resultar na multiplicação de agentes patogênicos, como por exemplo, *Salmonella* spp. devido a alterações no pH do trato gastrointestinal. (BONESI, SANTANA, 2008; ICMSF, 1980). Este patógeno reside no trato gastrointestinal de animais e homens, e é considerado um dos principais agentes relacionados a surtos alimentares no mundo, fazendo com que haja altos gastos econômicos com o tratamento de doentes. (KAKU et al., 1995; PARDI et al., 2001).

O objetivo do presente trabalho foi isolar e caracterizar o perfil de virulência de *Salmonella* spp. em carcaças de rãs-touro submetidos à diferentes períodos de jejum pré-abate.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da ranicultura e importância econômica para o Brasil

A introdução da rã touro no Brasil aconteceu por volta da década de 30 (LONGO, 1987). As condições de clima tropical e subtropical do país são favoráveis ao desenvolvimento e reprodução desses animais, os quais possuem um melhor desempenho de acordo com a elevação da temperatura (BRAGA; LIMA, 2001). Os sucessos de adaptação da rã-touro juntamente com altas propostas de rentabilidade estimularam produtores rurais a investirem na criação desses animais (AGOSTINHO, 2003; LONGO, 1987), ocorrendo uma alta difusão da criação dessa espécie por diversos locais do país (CUNHA; DELARIVA, 2009).

A rã-touro criada em cativeiro no Brasil com finalidade comercial foi escolhida por suas características zootécnicas como rusticidade e precocidade, pois algumas outras rãs nativas do Brasil também podem ser criadas em cativeiro, mas comparadas a rã-touro apresentam um desempenho produtivo bem inferior além de dificuldades técnicas (FERREIRA; PIMENTA; PAIVA, 2002).

Na década de 80 ocorreu um grande salto na produção ranícula, quando se introduziu rações mais balanceadas, aumentando significativamente o número de ranários. Entretanto, por diversos fatores como falta de conhecimento sobre comportamento e biologia do animal e falta de parâmetros zootécnicos, levaram muitos criadores a terem prejuízos, ocorrendo assim na década de 90 uma severa diminuição no número de ranários (LIMA; AGOSTINHO, 1988).

No início, os tanques de criação e engorda eram denominados tanques múltiplos (VIZOTTO, 1975) e os alimentos oferecidos aos animais eram compostos basicamente por restos de carcaças em decomposição para atrair insetos (moscas), que por sua vez resultavam no desenvolvimento de larvas, tendo por essas razões uma repercussão negativa sob os consumidores deste produto. Foi sucedida a essa estrutura outros sistemas de engorda como tanque-ilha (FONTANELLO *et al.*, 1984), confinamento (OLIVEIRA, 1983), anfigranja (LIMA; AGOSTINHO, 1988), gaiolas (FONTANELLO *et al.*, 1988), climatizado (FONTANELLO *et al.*, 1993) e inundado (MAZZONI *et al.*, 1995), com essa vasta opção de estruturas para fabricação de ranários, a maioria dos produtores decidiram

adicionar particularidades ou mesmo combinar sistemas, originando um sistema híbrido (FERREIRA; PIMENTA; NETO, 2002).

Ao longo das décadas, a ranicultura brasileira atravessou inúmeras fases, com uma variação no número de produtores e alternância nas tecnologias de criação. No ano de 2000 o Brasil contava com aproximadamente 600 ranários, 15 indústrias de abate e processamento, sete sob inspeção federal (SIF) e inspeção estadual (SIE) e oito com processos em andamento, seis associações estaduais de ranicultores e quatro cooperativas (LIMA; CRUZ; MOURA, 1999), além da Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura.

O Brasil é um dos destaques no cenário da produção ranícula mundial (AFONSO, 2012), e de acordo com dados divulgados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2009) o país ocupava a segunda colocação como maior produtor de rã, ficando atrás apenas de Taiwan. Segundo último dado disponibilizado pelo IBGE em 2006 o Brasil possuía 170 estabelecimentos de criação de rã, e gerou em 2015 cerca de 160 toneladas/ano (EMBRAPA, 2015).

Para melhoria do setor é fundamental um maior investimento do setor público na criação de rãs, da mesma maneira, organização do setor produtivo, construção de mais abatedouros e frigoríficos credenciados pelo serviço de inspeção além de um maior investimento em marketing (OLIVEIRA, 2015).

O maior consumo de carne de rã se encontra no Sudeste, devido a facilidade em se encontrar o produto tanto no mercado quanto em restaurantes (MOURA, 2003). Aproximadamente toda produção de rãs é destinada ao abastecimento do mercado interno brasileiro (CARDOSO, ROCHA, FURLAN, 2009).

Um dos fatores que contribuíram para a diminuição do consumo da carne de rã é que consumidores, especialmente mulheres, possuíam repulsão ao aspecto do animal congelado. Desta maneira têm se pesquisado diversas tentativas de ampliação para aumentar a oferta de produtos a partir da carne de rã. Dentre esses produtos se destacam patê da carne de rã, carne de rã desfiada, salsicha de rã, coxas de rã empanadas, entre vários outros (WEICHERT; MELO; ESPINDOLA, 2007).

2.2. Benefícios da carne de rã para a saúde dos consumidores

Não há muitos dados sobre o consumo da carne de rã no país, mas é estimado que os consumidores desse produto pertencem as camadas com maior renda e um melhor

nível sociocultural (CARRARO, 2008). Portanto apurar a qualidade nutritiva para o consumo humano e, por conseguinte, divulgar os resultados obtidos com a pesquisa contribuirão para estimular o mercado consumidor brasileiro para esta proteína (AZEVEDO, 1984).

Segundo Lima e Agostinho (1988), a carne de rã é recomendada por médicos nutricionistas por possuir taxa de gordura de 3%, além de ser a única carne produzida em cativeiro a possuir os dez aminoácidos básicos para os humanos com uma alta digestibilidade por possuir moléculas de cadeia curta, sendo altamente recomendada para crianças com intolerância a proteína animal.

Segundo Fabichak, (1985) a carne de rã é composta por água (82,73%), proteínas (17,13%), nitrogênio (2,83%), gordura (0,50%), minerais (0,65%). A digestibilidade da carne de rã crua é de 91,95 e a carne de rã cozida é de 83,91, seu teor de gordura é baixo, nota-se uma elevada porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados dentre eles ácido linoleico e ácido aracdônico (NOLL; LINDAU, 1987).

De acordo com EMBRAPA (2015), a carne de rã possui sabor suave (variando entre a carne de frango e peixe), e todos os seus benefícios nutricionais têm atraídos uma gama de consumidores na busca de uma alimentação mais saudável.

As pessoas que consomem a carne de rã procuram um alimento diferente, exótico, de fácil preparo e com vantagens nutritivas e saudáveis em relação às demais opções. Assim, inicialmente a cadeia de produção não busca consumidores assíduos, mas sim fazer com que seu consumo se torne uma opção para pessoas que queiram ampliar e variar o cardápio obtendo algo diferente e saboroso para consumir esporadicamente (NOLL; LINDAU, 1987). Já se encontra no Brasil pratos com carne de rã em restaurantes internacionais ou como aperitivo em bares e botecos da região Sudeste, principalmente em São Paulo e Rio de Janeiro (EMBRAPA, 2015).

2.3. Abate e processamento de rã

Os frigoríficos de abatedouros de rãs devem cumprir as normas dos órgãos de inspeção sanitária em consonância com o mercado a qual o alimento será destinado, tanto em nível Municipal, Estadual ou Federal (OLIVEIRA, 2015). A versão do RIISPOA publicada em 2017 traz mais informações que a anterior, como a necessidade da execução da inspeção *ante-mortem* de anfíbios, entretanto não determina normas para o procedimento de abate desses animais (BRASIL, 2017).

Por não haver ainda nenhuma norma sobre o tema, adere-se ao modelo estabelecido por pesquisadores e extrapolações de outros abates já bem consolidados na legislação. A prática operacional de um abatedouro de rãs é composta na seguinte ordem: insensibilização (termonarcore, eletronarcore ou concussão) e sangria, ambos na área suja, as etapas de esfolagem, evisceração e toailete são realizadas na área limpa, logo após os procedimentos a carcaça é embalada e resfriada (ALFANI, 2007).

Rãs prontas para o abate têm peso entre 200 e 300 gramas e com média de idade de aproximadamente 10 meses. Para o abate é realizado geralmente um jejum de 24 horas com a intenção de diminuir o conteúdo gastrointestinal, porém esse valor é uma extrapolação do que é utilizado para outros animais (LIMA; CRUZ; MOURA, 1999). Entretanto segundo Stéfani et al. (2015), após a avaliação da digestibilidade proteica em rãs touro, chegaram à conclusão que 36 horas é o tempo necessário para o alimento chegar ao fim do trato gastrointestinal.

A ausência da determinação de um tempo padrão de jejum pré-abate pode caracterizar riscos no quesito qualidade microbiológica da carcaça, pois é de fundamental importância esse procedimento no resultado final do produto. Jejum prolongado, superior ao tempo ideal pode diminuir a resistência das vísceras às trações mecânicas e eleva sua permeabilidade a micro-organismos. Por outro lado, valores inferiores ao ideal podem levar a ruptura intestinal durante a etapa de evisceração, podendo assim causar em ambos os casos contaminação da carcaça com agentes patogênicos, como por exemplo a *Salmonella* spp (MONLÉON, 2013; SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2016).

2.4. *Salmonella* spp e sua importância na saúde pública

Alimentos contaminados por microrganismos e suas substâncias tóxicas podem causar toxinfecções alimentares sendo assim um importante problema sanitário

(DAMASCENO et al., 2002). Os alimentos em geral têm papel importante pois são excelentes substratos para o crescimento de microrganismos sendo assim ótimos meios de cultura (JAY, 1992).

A *Salmonella* spp. é encontrada amplamente dispersa na natureza e pode ser encontrada em uma grande gama de hospedeiros (RABSCH et al., 2002). A salmonelose que é a doença causada por bactérias do gênero *Salmonella* spp está entre uma das toxinfecções alimentares mais importantes, (FORSYTHE, 2002; GERMANO; GERMANO, 2003; GUERIN; VOLD; VILTSLAND, 2005) e estão envolvidas em surtos registrados em diversos países (MAIJALA; RANTA; SEUNA, 2005); (TESSARI; CARDOSO; CASTRO, 2003)

A sua presença em determinados alimentos se torna um importante problema de saúde pública pois os sinais e sintomas podem ser suficientes para resultar em uma sobrecarga do sistema de saúde (FLOWERES, 1988). Portanto o controle dessa doença se torna um grande benefício para economia de países onde exista a ocorrência de surtos alimentares relacionados a este patógeno (SAKUGAWA et al., 2008).

De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - RDC nº 12/2001) é estabelecido que a *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25g de carnes resfriadas, congeladas ou *in natura* de rãs, bovinos, suínos e outros mamíferos (BRASIL, 2001). Apesar da bactéria não resistir ao aquecimento de 60°C durante 20 minutos, por ser sensível a altas temperaturas (GAMA, 2001), afeta tanto o consumo de rã ou de outros pescados por serem produtos normalmente ingeridos ao ponto ou mal passados.

A subnotificação de surtos envolvendo problemas de origem alimentar pelos serviços de vigilância sanitária é real e um problema mundial (SANTOS; NASCIMENTO; FLORES, 2002). Apenas 10% dos surtos provenientes de origem alimentar recebem notificação no Brasil, por ocorrência de falhas na fiscalização e notificação (FORSYTHE, 2002; GERMANO; GERMANO, 2003)

As infecções causadas por bactérias do gênero *Salmonella* spp. são consideradas mundialmente como as mais importantes causadoras de doenças (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996; FRANCO; LANGGRAF, 2004), apresentam alta morbidade e, acima de tudo, dificuldade da adoção de medidas para seu controle (GUERIN; VOLD; VILTSLAND, 2005)

Patogenicidade e virulência são dois termos relacionados ao microrganismo e a doença causada no hospedeiro, porém possuem significados diferentes. A primeira, define a capacidade de um microrganismo em causar doença, já virulência se refere a

gravidade da doença ocasionada pelo agente (BROOKS et al., 2009). Microrganismos patogênicos possuem habilidade de provocar doença, pela expressão de genes que codificam fatores de virulência (VIEIRA, 2009).

A *Salmonella* spp causa diferentes alterações no hospedeiro, e estas vão de infecções gastrointestinais brandas até infecções sistêmicas, dependendo do sorovar envolvido, da quantidade de inóculo, dos fatores de virulência que são expressos pelo agente e do estado imunológico do hospedeiro (OCHOA; RODRÍGUEZ, 2005).

A principal via de infecção por *Salmonella* spp é a fecal-oral, mas esta, também pode ocorrer pela pele lesionada, do trato digestivo, trato respiratório e pela conjuntiva (SCHWARTZ, 2000). Após o contato da bactéria com o organismo do hospedeiro por via oral, as salmonelas dão início ao mecanismo de patogenicidade, se aderindo e proliferando no intestino delgado. Em seguida ocorre a invasão da mucosa intestinal mediada por metabólitos bacterianos, que destroem a camada epitelial. As principais portas de entrada para o patógeno são as placas de Peyer e os enterócitos absortivos (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

2.5. Fatores de virulência em *Salmonella* spp.

Os fatores de virulência estão relacionados a diversos episódios da doença, como uma possível generalização do quadro, que antes se situava apenas como uma alteração gastroentérica, podendo ultrapassar a mucosa intestinal e invadir fagócitos, migrando para órgãos como fígado e baço (OHL; MILLER, 2001). As capacidades de modular a expressão dos seus genes de virulência, proporcionam a bactéria habilidades de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro, como o pH estomacal, aumento de temperatura, alta osmolaridade, ação da bile, lisoenzimas, lactoferrinas, entre outras. Estes fatores de virulência são codificados por genes de virulência que determinam a capacidade da bactéria causar doença (OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005; BESSA, 2006; VIEIRA, 2009).

Os genes de virulência podem estar presentes em elementos genéticos transmissíveis, como os plasmídeos, ou fazer parte de regiões específicas do cromossoma bacteriano, as chamadas ilhas de patogenicidade (VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005). O fator de virulência da *Salmonella* é uma combinação de fatores cromossomais e plasmídeos (OLIVEIRA, et al., 2003). Estes estão relacionados à capacidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, à resistência à ação do sistema complemento e à produção de toxinas (RODRIGUES, 2005).

As fimbrias são filamentos proteicos produzidos na superfície da bactéria. São de extrema importância e responsáveis pela fixação da bactéria à célula do hospedeiro, sendo fundamental para patogenicidade de *Salmonella* (CLOUTHIER et al., 1993; BISHOP et al., 2006).

Existem diferentes tipos de fimbrias, dentre as mais estudadas são: fimbria polar longa (Long Polar Fimbriae – LPF) e fimbrias agregativas (Aggregative fimbriae – AGF) (DARWIN; MILLER, 1999). A fimbria polar longa é a mais longa que as demais e está polarmente localizada na célula bacteriana e é codificado pelo gene *lpfA*. O operon *lpfA* está ligado a capacidade de adesão da *Salmonella* às células M do intestino. Em estudos realizados em ratos, foi demonstrado que a fimbria polar longa está envolvida no tropismo pelas placas de Peyer do intestino, sítio de infecção inicial dessa bactéria (BAUMLER et al., 1996). Outra função que pode estar relacionada a essa fimbria é a capacidade de conferir imunidade cruzada entre diferentes sorovares de *Salmonella* (NORRIS; BAUMLER, 1999). O gene é de extrema importância no começo da infecção após contaminação oral juntamente com outros genes relacionados a invasão (BAUMLER et al., 1996)

O gene *agfA* codifica a fimbria SEF 17 ou Tafi (Thin Aggregative Fimbriae) (COLLINSON et al., 1996). Uma de suas principais funções é proporcionar a interação inicial da bactéria com o intestino do hospedeiro (SUKUPOLVI et al., 1997). Estudos demonstraram que esta fimbria se liga a proteínas do hospedeiro em especial a fibronectina que facilita a sobrevivência da bactéria e a associação com o epitélio intestinal (COLLINSON et al., 1993). Além disso, esse gene também está relacionado a autoagregação da *Salmonella* que é essencial para aumentar a sobrevivência da bactéria frente a ácidos estomacais do hospedeiro, surfactantes e outros agentes bactericidas, pois a sua agregação diminui a superfície de contato (COLLINSON et al., 1991; COLLINSON et al 1993). A produção da SEF 17 também está relacionada com a formação de biofilmes, pois facilita a adesão da bactéria (WHITE et al., 2003).

O operon *sef* possui quatro genes (*sefABCD*) que são necessários para translocação e formação da fimbria SEF14, uma das principais do gênero *Salmonella*, cuja função está relacionada com as etapas de infecção posteriores a colonização do epitélio intestinal do hospedeiro, é considerada fundamental para a aderência ou sobrevivência da bactéria em macrófagos (EDWARDS; SCHIFFERLI; MALOY, 2000). A SEF14 contém quatro subunidades proteicas denominadas SefA, SefB, SefC e SefD. O gene *sefA* codifica a maior subunidade da proteína SefA e compõe a fimbria SEF14

(MIRMOMENI; KIANI; SISAKHTNEZHAD, 2008). Além de estar associado com a produção de fímbria, o gene *sefA* também está envolvido com a adesão do patógeno à determinadas regiões do aparelho gastrointestinal do hospedeiro, mais especificamente à região da placa de Peyer no intestino delgado (LIU et al., 2011).

O gene *invA* que codifica a proteína InvA da membrana interna da bactéria é fundamental para invasão das células epiteliais do hospedeiro. Aparentemente o gene é bastante conservado em todos os sorovares de *Salmonella*, sendo o gene utilizado como alvo para sua detecção pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (WHANG et al., 2009).

Os conjuntos de genes de virulência explicam a variedade de hospedeiros da *Salmonella*, auxiliando a bactéria na sobrevivência no organismo do hospedeiro. Então, estudos dos genes de virulência ajudam a compreender o potencial da *Salmonella* como causadora de infecção, e seus mecanismos de sobrevivência no hospedeiro (RHEN; DORMAN, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de coleta

O projeto foi realizado em um abatedouro-frigorífico de rãs localizado no município de Uberlândia pertencente a Universidade Federal de Uberlândia e as amostras foram analisadas no Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal FAMEV-UFU.

3.2. Caracterização dos grupos de animais e pontos de abate

Os animais eram procedentes de um mesmo complexo de produção, portanto estando todos submetidos às mesmas condições antes do início do experimento. Após o período de jejum de cada grupo, foi dado início imediatamente ao processo de abate desses animais de acordo com as normas vigentes na legislação brasileira (BRASIL, 1997; BRASIL, 2000; BRASIL, 2017)

Foram utilizadas 68 rãs com idades entre 4 e 6 meses e com média de peso de 355 gramas. Os animais foram então divididos em 4 grupos (grupo A= 0 horas de jejum (n=16 animais), grupo B=24 horas de jejum (n=18 animais), grupo C= 48 horas de jejum (n=16 animais), grupo D= 72 horas de jejum (n=18 animais) (OLIVEIRA et al., 2015 com adaptações; TEKE et al., 2014 com adaptações).

Com o objetivo de padronizar as coletas e reduzir influência de contaminações cruzadas, cada grupo utilizado neste experimento foi o primeiro a ser abatido no dia da coleta, imediatamente após a sanitização pré-operacional da sala de abate e autorização para início das atividades. Durante o processo de abate, amostras de cada grupo foram coletadas em dois momentos distintos do processamento: Após a sangria (A) e após a toaleta final (B).

3.3. Coletas das amostras

A amostras foram obtidas pelo método de enxágue de carcaça (CASON et al., 2006, adaptado). Para cada amostra foi utilizado um saco plástico contendo 100ml de NaCl (0,75%), sendo este conjunto previamente esterilizado através da autoclave. O enxágue foi realizado com o animal na própria linha de abate sendo necessário apenas colocá-lo dentro do saco plástico e em seguida massagear o conjunto (carcaça e salina) por 30 segundos. Após a coleta, as amostras permaneceram resfriadas em isopor com gelo até a chegada ao Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV-UFU), onde foram analisadas quanto a presença de *Salmonella* e avaliada a presença dos genes de virulência.

3.4. Isolamento de *Salmonella* spp

O isolamento de *Salmonella* spp. foi realizado seguindo os padrões internacionais de identificação (ISO 6579). Para tanto, 30 mL de cada homogenato foram transferidos para um frasco contendo 30 ml de NaCl (0,75%) H₂O peptonada 2%, resultando assim em um volume final de 60 mL de salina peptonada à 1% (Cason et al., 2006, adaptado).

Seguindo as recomendações da ISO 6579, as amostras foram então incubados em estufa a 37°C/24 horas (ISO, 2002). Após este período, uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo contendo 10 mL de caldo de enriquecimento seletivo Mueller-Kauffman Tetracionato (Oxoid) e 0,1 ml para tubo contendo 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis (Oxoid) e os caldos foram incubados a 37°C e 41,5°C por 24 horas respectivamente.

Posteriormente, foi realizada a semeadura em placas de Ágar *Salmonella* Shiguella (Ágar Desoxicholato-Citrato) e Ágar XLD (Ágar de desoxicolato-lisina-silose, Oxoid), incubando-as a 37°C/24 horas. As colônias típicas de *Salmonella* spp. foram submetidas a provas bioquímicas utilizando-se os ágares LIA (Lisina Iron Agar, Oxoid) e TSI (Triple Sugar Iron - Oxoid), ambos incubados a 37°C/24 horas. As reações típicas de LIA e/ou TSI foram transferidas para tubos com 10 mL de água peptonada 1% (Oxoid) e incubadas em estufa a 37°C por 24h. A etapa final consistiu em retirar os tubos da estufa, transferir 0,7 mL do caldo para microtubos (duplicatas) e adicionar 0,3 mL de Glicerol em cada microtubo, sendo realizado o congelamento da amostra para posterior

confirmação por metodologia molecular. As amostras foram reativadas para realização da PCR.

A confirmação dos isolados suspeitos foi feita por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tendo como alvo o gene *ompC*, responsável pela codificação de oligoproteínas externas da membrana da *Salmonella* e considerado um dos genes mais específicos para identificação e confirmação deste micro-organismo (ALVAREZ et al., 2004; ALMEIDA et al., 2013). O PCR para detecção de *Salmonella* spp foi feito no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO/FAMEV/UFU).

Para a realização do PCR, colônias suspeitas isoladas na etapa anterior dessa metodologia, foram submetidas à extração e purificação de DNA, utilizando o Kit de purificação Wizard Genomic DNA (Promega Corp., Madison, WI) conforme recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi então utilizado para a reação de PCR. Foram preparadas reações com volume de 25µL composta por 2µL de DNA da amostra, 12,5µL de GoTaq Green Master Mix (Promega), 8,5µL de água livre de nuclease (Promega) e 1µL de cada primer (gene *ompC*: *ompC*-F 5'-ATCGCTGACTTATGCAATCG-3' e *ompC*-R 5'-CGGGTTGCGTTATAGGTCTG-3') com concentração de 10pmol/µL. As condições utilizadas para a reação foram: 95°C por 2 minutos para desnaturação inicial, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação, 57°C por 1 minuto para anelamento, 72°C por 1 minuto para extensão, e após o término destes 30 ciclos, 72°C por 5 minutos para extensão final. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 15% e posteriormente corados com GelRed (Biotium, Inc., Hayward, CA) e observados em transiluminador. As amostras consideradas positivas para *Salmonella* apresentavam banda correspondente a 204 pares de base.

4. Pesquisa por genes de virulência

Os genes serão identificados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tendo como alvo os genes *lpfA*, *invA*, *sefA* e *agfA*, responsáveis pela patogenicidade da *Salmonella*. O PCR para detecção de genes de virulência foi feito no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Para a realização das análises de reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa de genes de virulência foi utilizado como controle positivo a cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076. As reações de PCR foram feitas com um volume final de 25µL, composto por 1 µL de DNA, 1,25 µL de 10 pmol/ µL da sequência *forward* e *reverse* de cada primer, 10,25 µL de H₂O ultrapura, 12,5 µL de Taq Green. As amostras foram submetidas aos seguintes ciclos de amplificação: desnaturadas inicialmente a 94° por 5 minutos, amplificadas em 35 ciclos de desnaturação a 94° por 45 segundos, anelamento a 58° por 30 segundos (*invA*); 50° por 30 segundos (*sefA* e *lpfA*); 66° por 30 segundos (*agfA*); extensão por 72° por 90 segundos, com extensão final a 72° por 10 minutos

Tabela 1. Sequência de genes de virulência, primers, peso molecular e referência bibliográfica.

GENE	PRIMERS	PESO MOLECULAR	REFERÊNCIA
<i>invA</i>	F:5'GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA3' R:5'TCATCGCACCGTCAAAGGAACC3'	284 pb	Oliveira et al. (2003)
<i>sefA</i>	F:5'GATACTGCTGAACGTAGAAGG3' R:5'GCGTAAATCAGGATCTGCAGTAGC3'	488 pb	Oliveira et al. (2003)
<i>agfA</i>	F:5'TCCACAATGGGGCGGGCGGCG3' R:5'CCTGACGCACCATTACGCTG3'	350 pb	Collinson et al. (1993)
<i>lpfA</i>	F:5'CTTTCGCTGCTGAATCTGGT3' R:5'CAGTGTTAACAGAAACCAGT3'	250 pb	Heuzenroeder et al. (2000)

F: forward; R: reverse; pb: pares de base

5. Resultados e Discussão

A positividade para salmonela em 68 amostras de carcaças de rãs-touro submetidas a diferentes períodos de jejum (0 à 72 horas) estão apresentados na tabela 2. Das 68 amostras analisadas para a presença de *Salmonella* spp., quatro (5,88%) foram positivas. De um total de quatro amostras três foram na etapa B, todas entre 0 e 24 horas jejum.

Tabela 2. Positividade para *Salmonella* em amostras de carcaças de rãs touro colhidas em duas etapas (A e B) de animais com diferentes períodos de jejum provenientes de um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG.

Jejum	n	Positividade para <i>Salmonella</i> spp	
		A	B
0	16	1 (6,25%)(1/16)	1 (6,25%)(1/16)
24	18	0	2 (11,11%)(2/18)
48	16	0	0
72	18	0	0
Total	68	1 (1,47%)(1/68)	3 (4,41%)(3/68)

* A- Etapa realizada com enxágue superficial após a insensibilização, concussão e sangria. B- Etapa realizada após a toaleta final.

Apesar de não haver trabalhos associando a presença de *Salmonella* spp com o tempo de jejum pré-abate para rã-touro, resultados obtidos com outras espécies de açougue podem auxiliar na compreensão destes resultados. Sampaio, (2017) avaliou um total de 180 bovinos *Bos indicus* (nelore) terminados em confinamento, divididos em grupos com 6, 12 ou 24 horas de jejum pré-abate. Foi constatado que a extensão do tempo de jejum resultou na maior contaminação da pele e também das carcaças por aeróbios mesófilos, *E. coli* genérica e coliformes totais.

Ludtke (2008), constatou que com o aumento do tempo de jejum, as aves sofrem estresse ocorrendo uma desestabilização da flora intestinal, de modo que abre espaço para a entrada de bactérias e auxilia no desenvolvimento de *Salmonella* spp. no ceco. Além disso, com o aumento do tempo de jejum o pH do papo aumenta, também favorecendo a proliferação de *Salmonella*. Portanto, com o aumento do tempo de jejum, ocorre uma elevação da carga microbiana no papo que pode levar ao rompimento de vísceras no processo de abate e, com isso, contaminando a carcaça.

A contaminação da carcaça está relacionada com a presença de conteúdo intestinal no interior ou exterior da carcaça eviscerada (MENDES; KOMIYAM, 2011). Um dos fatores determinantes para a contaminação da carcaça e conseqüentemente sua condenação, é o tempo inadequado de jejum pré-abate. Estudo de Silva et al. (2016) constataram que 14,43% das carcaças bovinas condenadas de um frigorífico no estado do Paraná estavam relacionadas com a contaminação por tempo incorreto de jejum pré-abate.

Diferentemente de outros animais como bovinos e aves, o jejum de vinte e quatro horas não foi suficiente para esvaziar o conteúdo gastrintestinal das rãs, Castro, (1996) e Braga, (1998) sugerem que o tempo de jejum pré-abate de rãs deve ser de 48 horas, para que ocorra adaptação ao meio e completo esvaziamento do tubo digestivo. O presente trabalho encontrou uma porcentagem maior de amostras positivas entre zero e vinte e quatro horas. Podendo estar relacionado a uma maior presença de conteúdo gastrintestinal ocasionando rompimento das vísceras conseqüentemente causando maior contaminação de carcaça nos períodos iniciais de jejum.

Nos animais pecilotérmicos, alguns fatores afetam a eficiência da digestão como o consumo de alimento, o nível de secreções de sucos digestivos, a atividade enzimática, a motilidade do trato gastrintestinal e a taxa de absorção intestinal (EDWARDS, 1971; KAPOOR et al., 1975; BRAGA; LIMA, 2001). Para Lima & Agostinho (1988) e Figueiredo (1996), a temperatura exerce uma forte ação sobre o metabolismo da rã-touro de maneira que a secreção gástrica aumenta em temperaturas mais elevadas ocasionando aumento dos processos digestivos.

Uma das hipóteses levantadas é de que o local que as rãs estavam alojadas poderia estar em uma temperatura mais baixas, deixando os animais com um metabolismo mais lento. Isto faria com que os animais demorassem mais tempo para completar sua digestão, levando um tempo maior para esvaziar o intestino. Porém, todas as coletas utilizadas no presente estudo foram realizadas nos meses de fevereiro a março, uma época com elevadas temperaturas, não sustentando a hipótese levantada.

Os resultados positivos também podem ser justificados pela introdução no abatedouro de rãs já contaminado, por algumas deficiências nas instalações ou então condições de higiene durante o abate, como água, manipulação das carcaças, favorecendo assim uma maior proliferação de microrganismos.

Tabela 3. Genes de virulência identificados em *Salmonella* spp isoladas de carcaças de rãs-touro abatidas em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG

Amostra	Data	Isolado*	Genes de virulência			
			<i>lpfA</i>	<i>sefA</i>	<i>agfA</i>	<i>invA</i>
1	11/03/2017	J0A	+	-	+	+
		J24B	+	-	+	+
2	12/03/2017	J24B	+	-	+	+
		J24B	+	-	+	+
3	18/03/2017	J0B	+	-	+	+
4	19/03/2017	J24B	+	-	+	+
		J24B	+	-	+	+

* J: jejum, 24,0: tempo de jejum, A: etapa de coleta, B: etapa de coleta

O gene *invA* é fundamental para invasão das células epiteliais do hospedeiro (WHANG et al., 2009). Foi constatado por ZOU et al., (2012) que 99,3% das cepas de *Salmonella* enterica sorovar Enteritidis, isoladas de surtos de salmonelose em humanos, possuíam o gene. GALDINO et al. (2013) observaram que em 94,4% das amostras de *Salmonella* possuíam fragmentos específicos para o gene *invA*. No presente trabalho todos os isolados foram positivos para o respectivo gene mostrando o potencial de invasão celular destas cepas de *Salmonella* obtidas nas carcaças de rã-touro.

Uma das principais funções do gene *agfA* é proporcionar a interação inicial da bactéria com o intestino do hospedeiro (SUKUPOLVI et al., 1997). Estudos demonstraram que esta fimbria se liga a proteínas do hospedeiro em especial a fibronectina que facilita a sobrevivência da bactéria e a associação com o epitélio intestinal (COLLINSON et al.1993). Além disso, esse gene também está relacionado a autoagregação da *Salmonella* que é essencial para aumentar a sobrevivência da bactéria frente a ácidos estomacais do hospedeiro, surfactantes e outros agentes bactericidas, pois a sua agregação diminui a superfície de contato (COLLINSON et al.,1991; COLLINSON et al 1993).

A produção da SEF 17 está relacionada com a formação de biofilmes, pois facilita a adesão da bactéria (WHITE et al., (2003). BORGES et al. (2013), encontrou uma positividade de 96% do gene *agfA* em cepas de *S. Enteritidis* isoladas de frangos na região sul do Brasil, assim como GALDINO et al. (2013) verificaram positividade para o gene em 94,4% das amostras, MENDONÇA (2016) observou positividade de 92,8% em *S.*

Enteritidis isoladas em carcaças de frango no Brasil. Assim como nos trabalhos dos autores citados a positividade neste estudo foi de 100% para o gene *agfA*.

O operon *lpfA* está ligado a capacidade de adesão da *Salmonella* às células M do intestino. Estudos demonstraram que esta fimbria se liga a proteínas do hospedeiro em especial a fibronectina que facilita a sobrevivência da bactéria e a associação com o epitélio intestinal (COLLINSON et al., 1993). Além disso a fimbria polar longa está envolvida no tropismo pelas placas de Peyer do intestino, sítio de infecção inicial dessa bactéria (BAUMLER et al., 1996). Outra função que pode estar relacionada a essa fimbria é a capacidade de conferir imunidade cruzada entre diferentes sorovares de *Salmonella* (NORRIS; BAUMLER, 1999). Observou-se no trabalho de BORGES et al. (2013) que 99% das cepas de *S. Enteritidis* isoladas de frangos na região sul do Brasil possuíam em o gene *lpfA*. No presente trabalho, apresentando similaridade com outros estudos, 100% das amostras apresentaram positividade para o gene *lpfA*.

O operon *sef*, cuja função está relacionada com as etapas de infecção posteriores a colonização do epitélio intestinal do hospedeiro, é considerada fundamental para a aderência ou sobrevivência da bactéria em macrófagos (EDWARDS; SCHIFFERLI; MALOY, 2000). Nenhuma amostra deste trabalho foi positiva para o gene *sefA*, portanto a bactéria perde parte de sua virulência por não sobreviver no interior de macrófagos, o gene *sefA* está presente nos sorotipos do grupo D, provavelmente as cepas não pertencem a este sorotipo. Ao contrário do encontrado no presente trabalho, BORGES (2011) encontrou em diferentes cepas de *S. Enteritidis* oriundas de diferentes origens avícolas a presença do gene *sefA* em 100% de suas amostras.

Todos os isolados apresentaram um mesmo perfil de virulência, sendo todos positivos para *lfpA*, *agfA* e *invA*. Apesar de exibirem o mesmo perfil as amostras não foram coletadas em um mesmo dia, podendo ser um indício de que há isolados geneticamente semelhantes circulando pela cadeia de produção deste estabelecimento, porém, estudos posteriores pelo uso da sorologia e PFGE (*Pulsed Field Gel Eletroforese*) podem auxiliar neste entendimento.

Outra observação importante é em relação às amostras dois e quatro que foram isoladas mais de uma colônia em uma mesma carcaça. Nesta situação existe a possibilidade desses isolados serem a mesma *Salmonella* spp, e para isso a sorologia e PFGE também poderão auxiliar nesta definição.

6. CONCLUSÃO

A presença de *Salmonella* foi confirmada na linha de abate de rã-touro, além disso há a positividade dos genes de virulência, que aumentam seu nível de patogenicidade e conseqüentemente o risco para o consumidor. Pode-se concluir com o trabalho que um jejum superior a 24 horas seria ideal para que não se identifiquem mais *Salmonella* na carcaça. O monitoramento e a adoção de processos de controle dentre as etapas de abate se tornam uma ferramenta de extrema importância no controle da contaminação de carcaças por *Salmonella*.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, A.M. Ranicultura se consolida com cadeia produtiva operando em rede interativa. **Revista Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 11, p. 33-35. 2012.
- AGOSTINHO, C.A. Desenvolvimento de linhagem comercial de rã-touro (*Rana catesbeiana*): produção de plantel unissexual. **Boletim Técnico do Instituto da Pesca**, São Paulo, n. 34, p. 7-11, 2003.
- ALFANI, R. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças e vísceras de rãs (*Rana catesbeiana* – Rã-Touro): Avaliação do processo de abate. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia. 2007.
- ALMEIDA, F., PITONDO-SILVA, A., OLIVEIRA, M.A., & FALCÃO, J.P. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v.19, p.145-151, 2013.
- ALVAREZ, J.; SOTA, M.; VIVANCO, A. B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.4, p.1734-1738, 2004.
- AZEVEDO, A.G. Análise da carne de rã-touro gigante, realizada pelo Laboratório da Fábrica de Rações Anhanguera. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA - ENAR, 4., 1984, Goiânia, Go. **Anais...** Goiânia: Associação Goiana dos Criadores de Rãs, 1984. p.217-219.
- BAUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; HEFFRON, F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cells lines by *Salmonella* Typhimurium. **Infection and Immunity**, v.64, n.5, 1996.
- BESSA, M.C. Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul. 2006. 145f. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BISHOP, A.L.; DOUGLAN, G.; BAKER, S. The *Salmonella* genome: a global review. In MASTROENI, P.; MASKELL, D. (Ed.) ***Salmonella* infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects**, 1. ed. New York: University Press, 2006. P.117-145
- BONESI, G.L.; SANTANA, E.H.W. Fatores tecnológicos e pontos críticos de controle de contaminação em carcaças bovinas no matadouro. UNOPAR. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.10, n.2, p.39-46, 2008.
- BORGES K.A., FURIAN T.Q., BORSOI A., MORAES H.L.S., Salle C.T.P. & Nascimento V.P. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** 33(12):1416-1422. 2013.

- BORGES, K. A. Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de Salmonella Enteritidis através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. Porto Alegre: UFRGS, 2011.
- BRAGA, L.G.T. Valor nutritivo de alguns alimentos para rã touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) na fase de recria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.203-209, 1998.
- BRAGA, L.G.T.; LIMA, S.L. Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã- touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) na fase de recria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p.1659-1663, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 05 jun 2017
- BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** – RIISPOA. Aprovado pelo Decreto 30.691 de 29/03/1952, alterado pelos Decretos n. 39.093 de 30/04/1956; n. 1.255 de 25/06/1962; n. 54.267 de 08/09/1964; n. 73.116 de 08/11/1973; n. 1.236 de 02/09/1994; n. 1.812, de 08/02/1996; n. 2.244 de 04/06/1997; e n. 6.385 de 27/02/2008, Brasília, 1998.
- BRASIL. MAPA. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** – RIISPOA. Decreto Nº 9.013 de 29 de março de 2017, Brasília, 2017
- BRASIL. **Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o Abate Humanitário de Animais de Açougue**. Aprovado pela Instrução Normativa 03 de 17/01/2000, Brasília, 2000.
- BRASIL. **Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos**. Aprovado pela Portaria 368 de 4/09/1997, Brasília, 1997
- BROOKS, G. F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; **Jawetz, Melnick e Adelberg: Microbiologia Médica**. 24 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 820p, 2009.
- CARDOSO, E.S.; ROCHA, H.M.O.; FURLAN, M.C. A piscicultura no município de Santa Maria, RS. **Ciência e Natura**, UFMS, v.31, n.1, p.131-140, 2009.
- CARRARO, K. C. Ranicultura: um bom negócio que contribui para a saúde. **Rev. FAE**, Curitiba, v.11, n.1, p.111-118, 2008.
- CASALI, A. P.; MOURA, O. M.; LIMA, S. L. Rações comerciais e o rendimento de carcaça e subprodutos de rã-touro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n.5, p. 1172-1178, 2005.

- CASON, J.A.; BERRANG, M.E.; SMITH, D.P. Recovery of bacteria from broiler carcasses rinsed zero and twenty-four hours after immersion chilling. **Poultry Science**, v.85, p.333-336, 2006. **Ciência Animal**, v.25, n.1, p.173-186. 2015.
- CASTRO, J.C. Estrutura funcional do tubo digestivo e adaptação de uma metodologia para determinar os valores de energia metabolizável de alimentos para rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). 1996. 120f. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa.
- CLOUTHIER, S.C.; COLLINSON, S.K.; LIPPERT, D.; AUSIO, J.; WHITE, A.P.; KAY W.W. Characterization of three fimbrial genes *sefABC*, of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.9, 1993. P.2523-2533
- COLLINSON, K.; DOIG, P.C.; DORAN, J.L.; CLOUTHIER, S.; TRUST, T.J.; KAY, W.W. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.1, 1993. p.12-18
- COLLINSON, K.; EMODY, L.; MÜLLER, K.H; TRUST, T.J.; KAY, W.W. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.15, 1991. p.4773-4781
- COLLINSON, K.; LIU, S.L.; CLOUTHIER, S.C.; BANSER, P.A.; DORAN, J.L.; SANDERSON, K.E.; KAY, W.W. The location of four fimbrin-encoding genes, *agfA*, *fimA*, *sefA* and *sefD*, on the *Salmonella* Enteritidis and/or *S. Typhimurium* *Xball-BlnI* genomic restriction maps. **Gene**, v.169, 1996. p.75-80
- CRIBB, A.Y.; AFONSO, A.M.; FERREIRA, C.M.. **Manual Técnico de Ranicultura**. Embrapa, ed.1. Brasília, DF, 2013.
- CUNHA, E. R.; DELARIVA, R. L. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802): uma revisão. **Revista Saúde e Biologia**, v.4, n.2, p.34-46, 2009.
- DAMASCENO, K.S.F.S.C. Condições higiênico-sanitárias de “self-services” do entorno da UFPE e das saladas cruas por eles servidas. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.102/103, p.74-78, 2002.
- DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.3, 1999. p.405-428
- EDWARDS, R.A.; SCHIFFERLI, D.M.; MALOY, S.R. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The USA**, v.97, n.3, 2000. p.1258-1262
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pesquisa investe em rã, desenvolve produtos, manual e cria rede de cooperação**. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/2773050/pesquisa-investe-em-ra-desenvolve-produtos-manual-e-cria-rede-de-cooperacao>>. Acesso em: 27 jun 2017.
- FABICHAK, Irineu. **Criação racional de rãs**. São Paulo: Nobel, 1985.

FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA NETO, J.S. Introdução à Ranicultura. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, v. 33, p. 1-15, 2002.

FERREIRA, C.M; FRANÇA, F.M.; DIA, D.C. **Curso técnico de criação de rãs**. Instituto de Pesca. 23p. São Paulo. 2009.

FIGUEIREDO, M. R. C. Influência dos fatores ambientais sobre o desempenho da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) em Gaiolas. Viçosa, MG: UFV, 1996. 149p. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.

FLOWERES, F. L. *Salmonella*. **Food Technology**; v.n.p. 1988.

FONTANELLO, D.; ARRUDA SOARES, H.; MANDELLI JR., J.; SANTOS, L.E.; PENTEADO, L.A.; CAMPOS, B.E.S.; REIS, J.M. Estação de reprodução da *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, criadas em ranário comercial e a influência de fatores climáticos sobre o número de desovas. **B. Inst. Pesca**, 11 (único): 123-130. 1984.

FONTANELLO, D.; WIRZ, R.R.; ARRUDA SOARES, H.; CAMPOS, B.E.S.; FREITAS, E.A.N.; FERREIRA, C.M. Comparação de quatro sistemas de engorda de Rãs-Touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802): Tanque-Ilha, Confinamento, Anfigranja e Gaiolas. 1 - Desenvolvimento ponderal; 2 - Custo operacional. **B. Inst. Pesca**, 20 (único): 43 - 58. 1993.

FONTANELLO, D.; WIRZ., R.R.; PENTEADO, L.A.; CAMPOS, B.E.S.; MANDELLI JR., J.; ARRUDA SOARES, H. Ganho de peso de Rãs-Touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), criadas em gaiolas de diferentes tamanhos. **B. Inst. Pesca**, v.n.p. 1988.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed; 2002.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu; 2004

GALDINO, V.M.C.A.; MELO, R.T.; OLIVEIRA, R.P.; MENDONÇA, E.P.; NALEVAIKO, P.C.; ROSSI, D.A. Virulência de *Salmonella* spp. de origem avícola e resistência a antimicrobianos. **Bioscience Journal**, v.29, n.4, p.932-939, 2013

GAMA, N.M.S.Q. *Salmonella* spp. em aves de postura comercial. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, p. 60. 2001.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela; 2003.

GUERIN, P. J., VOLD, L. A. A., VILTSLAND P. Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: a case study in Norway. **Eurosurveillance** v.n.p 2005.

HEUZENROEDER M.W.,MURRAY C.J. & DALCIN R.M. Molecular basis of benign colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. Rural Industries R&D Corporation 1:106. 2000.

- ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microbial ecology of foods**. Food commodities. New York: Academic Press, 1980.
- JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3a ed. Zaragoza: Acribia, 1992.
- KAKU, M.; PERESI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; BATISTA, A. B.; CASTANHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P; IRINO, K.; GELLI, D.S. Surto alimentar por *Salmonella enteritidis* no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.29, n.2, 1995.
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. A criação de rãs. Rio de Janeiro: **Editora Globo**, 1988. 172p.
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. A criação de rãs. São Paulo: **Globo**, 1988, 187p.
- LIMA, S.S.L.; CRUZ, T.A.; MOURA, O.M. Ranicultura: Análise da cadeia produtiva. **Ed. Folha de Viçosa**, Viçosa, 172 p. 1999.
- LIU, B. et al. PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 511-518. 2011.
- LONGO, A.D. Manual de Ranicultura: uma nova opção de pecuária. 1. ed. Rio de Janeiro: **Ediouro do campo**, 1987.
- LÓPEZ-LUNA, J.; VÁSQUEZ, L.; TORRENT, F.; VILARROEL, M. Short-term fasting and welfare prior to slaughter in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v.n., p.142-147, 2013.
- LUDTKE, C.B. et al. Principais problemas e soluções durante o manejo pré-abate das aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos. SP. Anais... São Paulo: **FACTA**, 2008. p.109-128
- MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA, E. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. **Food Control**; 16(8):669-675.2005.
- MAZZONI, R.; CARNEVIA, D.; ALTIERI, W.; MATSUMURA, Y. 1995 Cría de ranas en “Sistema Inundado”, experiencias en ranarios comerciales. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA & TECHNOFROG’95, 8, VIÇOSA. **Anais...** Viçosa: Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura e UFV, 1: 121-122. 1995
- MENDES, A. A.; KOMIYAMA, C. M. Estratégias de manejo de frangos de corte visando qualidade de carcaça e carne. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 1-6, 2011.
- MENDONÇA.E.P. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil, **Tese** (Doutorado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

MIRMOMENI, M.H.; KIANI, S.; SISAKHTNEZHAD, S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, n.11, 2008. p.1497-1501

MONLEÓN, R. Manejo de pré-abate em frangos de corte. **Aviagen Brief**. 2013. Disponível em: <http://cn.staging.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/Manejo-de-pr-abate-em-frangos-de-corte.pdf>. Acesso em: 22 de jun. 2017

MOURA, O.M. A rã e o uso potencial de seus derivados na indústria de alimentos. **Panorama da aquicultura**, v.13, n.80, p.27-31, 2003.

NATES, V. A.; FERREIRA, M.W.; TRINDADE, C. S. P. C.; SANTOS, R. M.; SILVA, T.A.S.; VALADARES, R.S.S. Filés de tambacu submetidos a salga seca e salga úmida. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, n.2, p.450-458, 2014.

NOLL, I. B.; LINDAU, C. P. Aspectos da composição em nutrientes da carne de rã-touro gigante. (*Rana Catesbiana*). **Caderno de Farmácia** v.3 n. 1/2 p. 29-36, 1987.

NORRIS, T.L.; BAUMLER, A.J. Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA**, v.96, n.23, 1999.

OCHOA, I. M. F.; RODRIGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidade *Salmonella* sp. **Review Article** [online], v.47, n.1-2, p.25-42, 2005. Disponível em: http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2e.pdf Acesso em: 22 Jul.2017.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Review Medical**[online], v.52, p.259-274, 2001.

OLIVEIRA, E.G. Ranicultura: novos desafios e perspectivas do mercado. **Ciência Animal**, v.25, n.1, p.173-186. 2015.

OLIVEIRA, F.R.; BOARI, C.A.; PIRES, A.V.; MOGNATO, J.C.; CRAVALHO, R.M.S.; SANTOS JÚNIOR, M.A.; MATTIOLI, C.C. Jejum alimentar e qualidade de frango de corte tipo caipira. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.16, n.3, p.667-677, 2015.

OLIVEIRA, G.A. Instalação de ranários. *In*: Encontro nacional de ranicultores, 3, 1983, Uberlândia, MA/MEC/UFU: 41-58. 1983.

OLIVEIRA, S. D., C. R. RODENBUSCH, G. B. MICHAEL, M. I. R. CARDOSO, C. W. CANAL, AND A. BRANDELLI. 2003. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Braz. J. Microbiol.** 34:123-124.

OLIVEIRA, S. D.; SANTOS L.R.; SCHUCHA D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE C.T.P.; CANAL, C.W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v.87, 2002. p. 25-35.

PARDI, M.C; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. Ciência, Higiene e Tecnologia de Carne. v.1, p.623. Goiânia, UFG. 2001.

- PELCZAR, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia, conceitos e aplicações: doenças transmitidas por água e alimentos. São Paulo: **Makron Books**; 1996.
- RABSCH, W.; ANDREWS, H.L.; KINGSLEY, R.A.; PRAGER, R.; TSCHÄPE, H.; ADAMS, L.G.; BÄULMER, A.J. *Salmonella enterica* serotype typhimurium and its host-adapted variants. **Infection and Immunity** v.70, n.5, p.2249-255, 2002.
- RHEN, M.; DORMAN, C.J. Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieus. **International Journal of Medical Microbiology**, v.294, p.487-502, 2005
- RODRIGUES, D.P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e materiais avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005. **Anais...**, Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, v.2, p.223-228, 2005.
- SAKUGAWA S.; BEZERRA, B.N K.; V; CASTRO, J.S M;MACHADO, L.C.E; FIREMAN DUTRA, R. A; DE LIMA, J L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 13(0) 1669-1674.2008.
- SAMPAIO, G. S. L. Jejum pré-abate de bovinos confinados e as condições higiênico-sanitárias do abate / Guilherme Sicca Lopes Sampaio. **Tese de Doutorado**. Botucatu, 2017.
- SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; FLORES, M. L. *Salmonella enteritidis* isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**. 16(102/103): 93-99.2002.
- SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis in: STRAW, B.E.; D'ALLAIRES, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. **Disease Swine**. 8th ed. Ames: Iowa University Press, 2000.
- SILVA, V. L.; GROFF, A. M.; BASSANI C. A.; PIANHO, C.R. Causas de condenação total de carcaças bovinas em um frigorífico do estado do Paraná. Relato de Caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** (v.10, n.4) p. 730 – 741, out - dez 2016.
- SILVA, V.L.; GROFF, A.M.; BASSANI, C.A.; PIANHO, C.R. Causas de condenação total de carcaças bovinas em um frigorífico do estado do Paraná. Relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.4, p.730-741, 2016.
- SOUZA, I.J.G.S.; PINHEIRO, R.E.E.; RODRIGUES, A.M.D.; JÚNIOR, M.H.K.; PENELUE, T. Condenações não patológicas de carcaças de frangos em um matadouro-frigorífico sob inspeção federal no estado do Piauí. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.1, p.68-77, 2016.
- STÉFANI, M.V.; PEREIRA, M M.; RECHE, M.R.; MANSANO, C.F.M. Fecal collection methods for the determination of protein digestibility in bullfrogs. **Ciência Rural**, v.45, n.8, p.1492-1495, 2015.

- SUKUPOLVI, S.; LORENZA, R.G.; GORDON, J.I.; BIAN, Z.; PFEIFER, J.D.; NORMARK, S.J.; RHEN, M. Expression of Thin Aggregative Fimbriae promotes interaction of *Salmonella* Typhimurium SR-11 with mouse small intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.65, n.12, 1997. p.5320-5325
- TEKE, B.; AKDAG, F.; EKIZ, B.; UGURLU, M. Effects of different lairage times after long distance transportation on carcass and meat quality characteristics of Hungarian Simmental bulls. **Meat Science**, v.96, p.224-229, 2014.
- TESSARI, E. N. C; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M. Prevalência de *Salmonella* Enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas. **Higiene Alimentar**; 17(107):52-55. 2003.
- VAN ASTEN, A.J.A.M.; VAN DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v.44, n.3, 251-259, 2005.
- VIEIRA, M.A. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v.33, n.4, p.406-414, 2009.
- VIZOTTO, L. D. 1975 *Ranicultura*. (monografia). 43p.
- WEICHERT, M. A.; MELLO, S. R. P.; ESPINDOLA, L. M. O consumo de tilápias e rãs nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 102, p. 37- 41, jul./ago. 2007.
- WHANG, Y.P.; LIA,L.; SHENA, J.Z.; YANGB, F.J.; WU, Y.W. Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA* growth and intracellular invasion and survival. **Veterinary Microbiology**, v. 133, n.4, p.328-334, 2009.
- WHITE, A.P.; GIBSON, D.L.; COLLINSON, S.K.; BANSER, P.A.; KAY, W.W. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.18, 2003. p.5398-5407.
- ZOU, M.; KEELARA, S.; THAKUR, S. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans by Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE**, v.9, n.3, p.232-238, 2012.