

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PRISCILA CRISTINA COSTA**

**IMPACTO DE DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM PRÉ-ABATE NA  
ENUMERAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES E PRESENÇA  
DE *Salmonella* spp. EM CARÇAÇAS DE RÃS-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

**UBERLÂNDIA**

**2019**

**PRISCILA CRISTINA COSTA**

**IMPACTO DE DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM PRÉ-ABATE NA  
ENUMERAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES E PRESENÇA  
DE *Salmonella* spp. EM CARCAÇAS DE RÃS-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias, da Faculdade de Medicina  
Veterinária da Universidade Federal de  
Uberlândia, como parte dos requisitos  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências Veterinárias.**

**Área de Concentração: Saúde animal**

**Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius  
Coutinho Cossi**

**UBERLÂNDIA**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

C837i  
2019 Costa, Priscila Cristina, 1989  
Impacto de diferentes períodos de jejum pré-abate na enumeração de micro-organismos indicadores e presença de *Salmonella spp.* em carcaças de rês-touro (*Lithobates catesbeianus*) [recurso eletrônico] / Priscila Cristina Costa. - 2019.

Orientador: Marcus Vinícius Coutinho Cossi.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1341>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Rês. 3. Salmonelose. 4. Alimentos - Contaminação.  
I. Cossi, Marcus Vinícius Coutinho, 1985, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

---

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

IMPACTO DE DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM PRÉ-ABATE NA  
ENUMERAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES E PRESENÇA DE  
*Salmonella* spp. EM CARÇAÇAS DE RÃS-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

Tese aprovada para a obtenção do  
título de Mestre no Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias,  
da Universidade Federal de  
Uberlândia, pela banca examinadora  
formada por:

Uberlândia, 09 de abril de 2019.

---

Prof. Dr. Marcus Vinícius Coutinho Cossi, UFU/MG

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daise Aparecida Rossi, UFU/MG

---

Prof. Dr. Ricardo Seiti Yamatogi, UFV/MG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

## ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO Nº PPGCV/011/2019				
Data:	09 de Abril de 2019	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:00
Matrícula do Discente:	11712MEV015				
Nome do Discente:	PRISCILA CRISTINA COSTA				
Título do Trabalho:	Impacto de diferentes períodos de jejum pré-abate na enumeração de bioindicadores e presença de <i>Salmonella</i> spp em carcaças de rês-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> )				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	EPIDEMIOLOGIA DE ZOONOSES				

Reuniu-se na sala 2D54, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em **Ciências Veterinárias**, assim composta: Professores Doutores: **Daise Aparecida Rossi** - Universidade Federal de Uberlândia; **Ricardo Seiti Yamatogi** - Universidade Federal de Viçosa; e **Marcus Vinícius Coutinho Cossi** orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. **Marcus Vinícius Coutinho Cossi**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Marcus Vinicius Coutinho Cossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/04/2019, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daise Aparecida Rossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/04/2019, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Seiti Yamatogi, Usuário Externo**, em 09/04/2019, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1123824** e o código CRC **0BA62A68**.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço os meus pais, Lusia Teresinha das Graças Costa e Humberto José da Costa, por sempre me incentivarem nos estudos, por todos os esforços de me formar em uma Universidade Federal, pelo apoio e amor incondicional e por entenderem minhas ausências devido aos estudos. À minha irmã, Jaque, por ser meu modelo, minha melhor amiga, sempre estar comigo me ajudando no que eu preciso, inclusive nas correções dos meus trabalhos da faculdade. Amo muito vocês.

Ao meu orientador Marcus, por ter aceitado me orientar, por toda sua paciência, por todos os seus ensinamentos, por seu empurrão pra eu ir pra uma Faculdade em outra cidade, foi muito válido. Pela compreensão e grande ajuda num momento difícil pra mim. Te admiro muito como professor.

Ao meu namorado Renato, pelo seu amor, carinho, compreensão, por me incentivar nas horas de desânimo, e me acalmar nas horas de desespero. Por estar ao meu lado e por entender as minhas ausências e meus atrasos. Por me fazer feliz.

À minha amiga de graduação, Ana Maria, e amigos da residência, Amanda e Wilson, por sempre me ajudarem durante esses últimos anos, por sempre ouvirem meus desabafos e me alegrar quando eu precisava. Aos amigos que fiz durante o mestrado, são muitos, não foi citar o nome de todos, mas preciso muito agradecer a Tati, ao Pedro e a Letícia, pela amizade e ajuda nos experimentos, teria sido muito difícil sem ajuda de vocês. À Débora também, por toda ajuda e por ser minha companheira nos momentos bons e ruins do mestrado.

Obrigada aos funcionários do setor do Ranário da Fazenda do Glória da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela ajuda nas coletas durante todo o experimento, pela paciência e dedicação para tudo dar certo.

Ao técnico do laboratório Alexandre, pela ajuda nos experimentos quando mais eu precisava, e pelos vários momentos divertidos. À todos do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da UFU, por sempre tirarem minhas dúvidas, por me ensinarem com paciência, sempre prestativos para me ajudar. À Prof. Dra. Daise por disponibilizar seu laboratório para realização de parte do experimento. Banner, nem tenho palavras para te agradecer, muito obrigada por tudo!

Ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UFU, pela disponibilidade de espaço e de materiais para realização de algumas análises. Ao Laboratório de

Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Viçosa, pela ajuda em parte das análises, e ao Prof. Dr. Ricardo pela grande ajuda e ensinamentos. Ao laboratório Biomol (Núcleo de Análises de Biomoléculas) da UFU também por ceder espaço para realização do experimento.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária pela oportunidade de realização do curso de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada a todos que fizeram parte de alguma forma deste trabalho e do meu crescimento como Médica Veterinária.

## RESUMO

A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é atualmente a principal espécie utilizada na ranicultura no Brasil. O consumo de sua carne tem se mostrado um mercado em ascensão, principalmente pelos benefícios que este produto representa para a saúde do consumidor. Por esse motivo, tem sido cada vez mais importante o cuidado quanto à contaminação microbiológica dessa carne durante todo seu processamento. Porém, uma das dificuldades na obtenção de um produto de qualidade é a falta de padronização durante o abate e processamento da carne de rã. Não existe na legislação brasileira um tempo de jejum pré-abate específico para a espécie, e um jejum inadequado, por sua vez, pode levar a contaminação microbiológica da carcaça. Objetivou-se com este trabalho avaliar o impacto de diferentes tempos de jejum pré-abate na contaminação microbiológica da carcaça de rã-touro afim de preconizar um período de jejum ideal baseado na inocuidade do produto. O primeiro capítulo da dissertação é referente às considerações gerais acerca dos assuntos abordados no artigo, como os aspectos econômicos da ranicultura, o abate de rãs, importância dos micro-organismos indicadores e *Salmonella* spp. no processo de abate e na saúde pública. No segundo capítulo objetivou-se avaliar o impacto de diferentes períodos de jejum pré-abate na contagem de micro-organismos indicadores e na presença de *Salmonella* spp. em carcaças de rãs-touro abatidas em um estabelecimento de Uberlândia-MG, Brasil. Além disso foi realizada a caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* spp. isoladas das carcaças, sendo avaliada a presença de genes de virulência (*invA*, *lpfA*, *sefA*, *sopB*, *spaN*, *spvB*, *orgA*, *pagC*, *msgA*, *iroN* e *cdtB*) pela técnica de PCR e a sensibilidade a dez antimicrobianos pelo teste de disco difusão.

**Palavras-chave:** Abate de rãs. Doenças veiculadas por alimentos. *Escherichia coli*. Salmonelose. Patogenicidade.

## ABSTRACT

The bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) is currently the main species used in raniculture in Brazil. The consumption of its meat has been shown a rising market, mainly by the benefits that this product represents for the health of the consumer. For this reason, it has been increasingly important to care for the microbiological contamination of this meat throughout its processing. However, one of the difficulties in obtaining a quality product is the lack of standardization during the slaughter and processing of frog meat. There is no pre-slaughter fasting time specific for the species in Brazilian legislation, and an inadequate fasting may lead to microbiological contamination of the carcass. The objective of this work was to evaluate the impact of different pre-slaughter fasting times on the microbiological contamination of bullfrog carcass in order to recommend an ideal fasting period based on product safety. The first chapter of the dissertation refers to general considerations about the subjects covered in the article, such as the economic aspects of ranching, the slaughter of frogs, the importance of indicator microorganisms and *Salmonella* spp. in the slaughter process and in public health. In the second chapter, the objective was to assess the impact of different periods of pre-slaughter fasting on the count of indicator microorganisms and the presence of *Salmonella* spp. in carcasses of bullfrogs slaughtered in an establishment in Uberlândia-MG, Brazil. In addition, the phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* spp. isolated from the carcasses, being evaluated the presence of virulence genes (*invA*, *lpfA*, *sefA*, *sopB*, *spaN*, *spvB*, *orgA*, *pagC*, *msgA*, *iroN* and *cdtB*) by the PCR technique and the sensitivity to ten antimicrobials by the diffusion disk test.

**Keywords:** Slaughter of frogs. Foodborne Illness. *Escherichia coli*. Salmonellosis. Pathogenicity.

## LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1.** Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (log UFC/gramas) em amostras de carcaças de rês-touro em diferentes tempos de jejum pré-abate e coletadas em dois pontos do processo de abate em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG. .... 49
- Tabela 2.** Contagem de coliformes a 35°C (log UFC/g) em amostras de carcaças de rês-touro, em diferentes tempos de jejum e em dois pontos da linha de abate em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG. .... 50
- Tabela 3.** Frequência de *Escherichia coli* em amostras de carcaças de rês-touro, em diferentes períodos de jejum e em dois pontos de coleta no abate (ponto A: após sangria e ponto B: após a toaleta), em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG..... 51
- Tabela 4.** Frequência de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças de rês-touro, em diferentes períodos de jejum pré-abate e em dois pontos no abate (ponto A: após sangria e ponto B: após a toaleta), em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia ..... 51
- Tabela 5.** Perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de rês-touro, em dois pontos no abate (ponto A: após sangria e ponto B: após a toaleta), em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia. .... 52
- Tabela 6.** Perfil de virulência de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de rês-touro, em dois pontos no abate (ponto A: após sangria e ponto B: após a toaleta), em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia. .... 53

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2.OBJETIVOS.....	13
2.1.Objetivo geral.....	13
2.2.Objetivos específicos.....	13
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1.Aspectos econômicos relacionados à ricultura.....	14
3.2.Caracterização do Abate de rãs.....	15
3.3.Micro-organismos indicadores e <i>Salmonella</i> spp. associada a produtos de origem animal.....	18
3.4.Genes de virulência em <i>Salmonella</i> spp.....	22
3.5.Resistência a antimicrobianos de <i>Salmonella</i> spp.....	24
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 2.....	38
RESUMO.....	39
ABSTRACTS.....	41
1.INTRODUÇÃO.....	43
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1.Caracterização do local de coleta.....	44
2.2.Coleta das amostras.....	45
2.3.Análise microbiológica.....	45
2.4.Análise de dados.....	49
3.RESULTADOS.....	49
4.DISSCUSSÃO.....	53
5.CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

## **CAPÍTULO 1**

### **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1. INTRODUÇÃO

A ranicultura é a criação comercial de rãs em cativeiro, sendo a *Lithobates catesbeianus*, conhecida popularmente como rã-touro americana, a principal espécie utilizada na ranicultura brasileira, devido a características como rusticidade, alta fecundidade e crescimento rápido, tendo maior desempenho em cativeiro do que outras espécies de rãs (FERREIRA; FRANÇA; DIA, 2009).

Após um período de enfraquecimento da atividade no Brasil, atualmente a ranicultura tem apresentado potencial de crescimento, devido a avanços tecnológicos e investimentos na área, como também grande potencial de exportação da carne e expansão do mercado consumidor interno (OLIVEIRA, 2015).

A carne de rã possui várias características benéficas para a saúde, além de possuir todos os aminoácidos essenciais para os seres humanos, tem um alto valor biológico, baixo teor de gordura, alta digestibilidade e cálcio disponível em concentrações maiores do que em produtos lácteos (LIMA, 1999; CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013; AFONSO et al., 2016). Essa garantia de qualidade e principalmente inocuidade do produto ofertado é diretamente dependente da eficiência da atividade de inspeção realizada nos estabelecimentos produtores.

No Brasil, de acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, os anfíbios são classificados como pescados. Ainda segundo o regulamento, para garantir a qualidade dos produtos ofertados no comércio, a fiscalização deve ser feita em caráter permanente e diferentemente dos peixes, os anfíbios devem passar pela inspeção *ante-mortem* (BRASIL, 2017).

Dentro de toda a cadeia produtiva, o abate é considerado um dos elos que pode afetar a qualidade microbiológica da carne, especialmente no abate de rãs, já que não há uma padronização dos parâmetros para essa espécie, sendo utilizadas extrapolações do abate de outros animais (BRASIL, 1998; COSSI et al., 2014). Um exemplo é o período de jejum pré-abate, sendo realizado normalmente o jejum de 24 horas para as rãs, porém a falta de um parâmetro específico oficial para a espécie pode representar um perigo para a qualidade e inocuidade do produto final (LÓPEZ-LUNA et al., 2013; NATES et al., 2014).

Um período de jejum pré-abate inadequado (maior ou menor do que o necessário) pode levar a um rompimento das vísceras durante a retirada das mesmas no processo de abate, aumentando as chances de contaminação da carcaça por bactérias intestinais patogênicas, como *Salmonella* spp. (ICMSF, 2006; BONESI, SANTANA, 2008). Este micro-organismo habita o

trato intestinal de animais e do homem, e é um dos principais agentes associados a surtos alimentares no mundo, levando a gastos econômicos com tratamento de doentes, podendo até causar a morte, principalmente de crianças, idosos e pessoas imunodeprimidas (KAKU et al., 1995; PARDI et al., 2001).

Mas o simples fato de encontrar *Salmonella* spp. nos alimentos não é hoje a única preocupação. Nos últimos anos, muitas cepas isoladas de *Salmonella* spp. têm se mostrado resistentes a diversos agentes antimicrobianos o que se deve principalmente ao uso indiscriminado dos antimicrobianos na criação dos animais de produção e a pressão seletiva assim provocada (CARRAMIÑANA; ROTA; HERRERA, 2004; HUR; JAWALE; LEE, 2012; COSSI et al., 2014; YANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Estas observações científicas afetam diretamente a saúde pública, pois, cada vez mais, os medicamentos utilizados no combate à infecção alimentar causada por *Salmonella* spp. se tornarão ineficazes, aumentando os índices de morbidade e mortalidade (OLIVEIRA et al., 2005; RAUFU et al., 2014).

Além da resistência a antimicrobianos, a pesquisa por genes de virulência também é considerada importante, pois oferece um potencial do dimensionamento da patogenicidade dos isolados de *Salmonella* spp. associados com alimentos (CAPUANO et al., 2013; YANG et al., 2015). Reafirmando esta preocupação, Yang et al. (2015) mostraram a existência de isolados de *Salmonella* spp. encontrados em alimentos originados de animais aquáticos com a presença de múltiplos genes de virulência, evidenciando mais uma vez a necessidade de atenção para com a saúde pública.

Como anfíbios também são reservatórios intestinais de *Salmonella*, ressalta-se a importâncias de estudos que ajudem a estabelecer um tempo de jejum ideal para o abate de rãs, relacionando com a possível contaminação da carcaça por bactérias.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Identificar um período ideal de jejum pré-abate (0, 24, 48 ou 72 horas) para rãs-touro, baseado na contaminação microbiana da carcaça durante o abate.

### 2.2. Objetivos específicos

Avaliar em carcaças de rãs-touro abatidas após 0, 24, 48 e 72 horas de jejum pré-abate:

- A contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e coliformes a 35°C;
- A presença de *Escherichia coli*;
- A presença de *Salmonella* spp.:
  - Perfil de virulência dos isolados;
  - Perfil de resistência antimicrobiana dos isolados.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Aspectos econômicos relacionados à ranicultura

A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é uma espécie nativa dos Estados Unidos, e os primeiros animais chegaram ao Brasil em 1935, trazidos por canadenses com o objetivo de implantar no Rio de Janeiro o primeiro criadouro comercial no país. Apesar de inicialmente a criação ser de forma empírica, a mesma já era realizada em sistema confinado, diferente de outros países que utilizavam o extrativismo (OLIVEIRA, 2015).

A expansão da ranicultura brasileira ocorreu apenas na década de 80, com um posterior declínio na produção nos anos de 1990 e 2000 devido a dificuldades encontradas pelos produtores na produção, como a falta de investimentos e poucas pesquisas na área de nutrição, e dificuldades na exportação das rãs vivas, devido problemas sanitários e valorização do real (Plano Real) (LIMA, 2012; OLIVEIRA, 2015). Mas, desde 2010, a perspectiva tem sido de expansão da atividade, com avanços tecnológicos e zootécnicos na produção, melhorando a qualidade da carne e aumentando a produtividade, visando o mercado externo e o interno que está em crescimento, devido ao aumento da procura por alimentos mais saudáveis, além da possibilidade de diversificação dos produtos, como produção de patês, linguças, e também de cosméticos (OLIVEIRA, 2015).

Dados sobre a produção de rãs em cativeiro para fins comerciais são escassos e defasados. Segundo informação da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) de 2013, o Brasil era o segundo maior produtor de rãs, estando atrás apenas de Taiwan. Já de acordo com Oliveira (2015), os principais produtores mundiais de carne de rã são: Bangladesh, Bélgica, China, Indonésia, Japão, México e Taiwan, e de acordo com Afonso (2012), a produção nesses países é semi-intensiva, ou seja, somente uma parte do ciclo da produção é realizada em cativeiro.

Apesar de não estar entre os maiores produtores, o Brasil se destaca na ranicultura mundial devido ao desenvolvimento de tecnologias, principalmente por universidades, para aprimoramento das instalações e manejo, melhorando a produção (OLIVEIRA, 2015). Os maiores exportadores são os Estados Unidos, Bélgica, França e Holanda (TEIXEIRA, 2002). Os Estados Unidos também está entre os maiores consumidores de carne de rãs, junto com a França, Canadá, Bélgica, Itália, Espanha, Holanda, Suíça, China e Japão (ALTHERR et al., 2011; FAO, 2013; AFONSO et al., 2016).

Em relação à produção nacional, os dados oficiais mais recentes são de 2006, indicando uma produção de 598 toneladas de carne de rã, sendo os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro os maiores produtores (BRASIL, 2007). O consumo da carne de rã é maior no Sudeste, provavelmente devido à facilidade de encontrar o produto no comércio e em restaurantes (MOURA, 2003). Praticamente toda a produção da ranicultura brasileira é para abastecer o mercado interno (CARDOSO; ROCHA; FURLAN, 2009), mas de acordo com a Sociedade Nacional de Agricultura (2013), a demanda da carne de rã no país ainda é maior que a oferta. Esse cenário pode ser um atrativo para novos produtores, visando além do mercado interno, o mercado externo, já que o consumo de carne de rãs em outros países é maior que no Brasil (CARRARO, 2008).

Outro nicho que pode ser explorado e render um bom retorno financeiro é o aproveitamento dos coprodutos. A carne de rã normalmente é comercializada congelada em duas formas de apresentação: carcaça inteira ou somente as coxas. Ainda é pouco expressivo o aproveitamento do restante da carcaça, que poderia ser utilizada para produção de embutidos, de hambúrguer ou patês, agregando valor ao produto e conseguindo maior aceitabilidade dos consumidores. Outras partes também podem ser aproveitadas como coprodutos, como o couro para fabricação de vestimentas, a gordura que pode ser utilizada na indústria de cosméticos e a pele *in natura* no tratamento de queimaduras (CASALI; MOURA; LIMA, 2005; CARRARO, 2008; AYRES et al., 2015).

Segundo Oliveira (2015), para o avanço da ranicultura nacional é necessário maior investimento do setor público na atividade, assim como, organização do setor produtivo e melhorias no sistema de criação como o desenvolvimento de ração própria para as rãs, criação de mais abatedouros frigoríficos credenciados pelos serviços de inspeção e investimento dos produtores em marketing.

### **3.2. Caracterização do Abate de rãs**

Os abatedouros frigoríficos de rãs devem seguir normas específicas dos órgãos de inspeção sanitária de acordo com o mercado a que se destina o alimento, seja em nível municipal, estadual ou federal (OLIVEIRA, 2015). No Brasil, a inspeção e a fiscalização industrial e sanitária de produtos de origem animal são regulamentadas por normas que visam garantir a produção de produtos inócuos, como também a preservação da identidade e qualidade dos mesmos, assegurando a saúde do consumidor (BRASIL, 2017).

Em 1952 foi aprovado o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) do Decreto nº 30.6919 (BRASIL, 1952), o mesmo passou por atualizações e em 2017 foi publicado o Decreto nº 9.013 (BRASIL, 2017). No regulamento, os anfíbios são classificados como pescados, e no decreto mais recente são especificadas as características sensoriais que devem ser avaliadas na inspeção *post mortem* dos anfíbios, informações que não existiam no decreto anterior. Apesar de ter sido acrescentado informações em relação à inspeção de carne de rãs (anfíbios) no Decreto nº 9.013, ainda não há normas específicas sobre os procedimentos de abate desses animais (BRASIL, 2017).

Não havendo até o momento nenhuma norma complementar sobre o tema, segue-se como modelo, padrões estabelecidos por pesquisadores e pela EMBRAPA, muitas vezes resultado da extrapolação de conhecimentos aplicados à outras espécies de animais, como peixes, frangos e outros animais de açougue (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

As rãs são abatidas com idade aproximada de 10 meses e peso médio de 350 gramas. Antes do abate normalmente se realiza o jejum de 24 horas para reduzir o conteúdo gastrointestinal, mas como já foi dito, esse valor é uma extrapolação do que é realizado para os outros animais, principalmente peixes (LIMA, 1999; CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013). Os animais selecionados para o abate não devem ter feridas, deformações/malformações, e devem ter conformidade de tamanho. A rotina operacional de um abatedouro frigorífico de rãs segue a seguinte ordem: insensibilização (termonarrose ou eletronarrose), sangria (corte da região gular) e esfolia na área suja, evisceração e toailete na área limpa, e em seguida a carcaça é embalada e resfriada (ALFANI, 2007). Dentre as etapas de produção e processamento, algumas se destacam por seu elevado potencial de contaminação do produto final e merecem atenção durante o abate.

A primeira delas é a qualidade da água e a higiene do ambiente de criação. Diferente de muitas espécies de produção, as rãs podem ser produzidas em baias inundadas por água, criando neste ambiente condições favoráveis para a contaminação cruzada e gerando influência direta na contaminação da pele dos animais que chegam para o abate. Apesar de terem poucos dados sobre a qualidade ideal de água para rãs, deve-se ter um cuidado máximo com a higiene dos tanques e com a renovação e qualidade da água, para evitar a inserção, manutenção e proliferação de bactérias na cadeia produtiva (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

Além da qualidade da água, o período de jejum pré-abate é uma variável extremamente importante e pouco conhecida na produção e processamento de rãs-touro. O jejum pré-abate tem a finalidade de diminuir a contaminação do abatedouro e da carcaça por micro-

organismos presentes no intestino dos animais (WSPA, 2010). Um jejum prolongado pode causar enfraquecimento e conseqüentemente rompimento das paredes dos intestinos durante a evisceração, além de afetar o pH intestinal favorecendo a multiplicação de micro-organismos intestinais patogênicos, como *Salmonella* (ICMSF, 1980; MENDES, 2001; BONESI; SANTANA, 2008). Um jejum muito curto, no entanto, também pode levar a ruptura do intestino durante o processo de abate, devido ao enchimento das vísceras. Além do impacto na contaminação microbiológica, o tempo de jejum pré-abate também pode afetar o rendimento da carcaça, custo da produção e bem-estar animal (MENDES, 2001; MONLÉON, 2013; SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2016).

Em trabalho publicado por Stéfani et al. (2015), onde se estudou digestibilidade proteínica em rês-touro, foi observado que o período 36 horas é o tempo necessário para o alimento ingerido chegar na parte final do trato gastrointestinal. Porém, há poucos estudos sobre a taxa de passagem de alimentos no trato digestivo de rês e principalmente estudos que relacionam estes valores com o tempo de jejum pré-abate e a contaminação microbiológica da carcaça.

Já no início do abate a etapa que mais impacta na qualidade microbiológica da carcaça é a esfola, pois, sua correta execução exerce um papel importante no sentido de definir a intensidade e natureza da contaminação das carnes. Esse procedimento deve ser realizado de forma correta, já que a pele dos animais é o local onde a carga microbiana é maior e, portanto, deve-se evitar durante essa técnica o contato da pele do animal com a carcaça (carne) (BONESI; SANTANA, 2008). Diferentemente de bovinos e outros animais de abate, a esfola nas rês é feita manualmente, portanto é preciso que o funcionário esteja consciente e treinado para realizar a higienização das mãos e utensílios e também para realizar a técnica corretamente (ICMSF, 1980; CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

Outra característica do abate de rês é que tem relação com a contaminação final da carne produzida é a não realização da oclusão do reto antes da evisceração, que é realizada em outros animais de abate (BRASIL, 2017). Nesta etapa o risco de rompimento ou perfuração de vísceras faz deste procedimento um ponto crítico do abate, pois pode ocorrer contaminação da carcaça por bactérias gastrointestinais, afetando a inocuidade do produto ofertado (ICMSF, 1980; BONESI; SANTANA, 2008).

Por existirem estas variadas fontes e possibilidades de contaminação durante o abate e processamento da rês-touro, o monitoramento da qualidade microbiológica passa a ser uma forma útil de controlar os perigos e diminuir os riscos biológicos neste produto (BRANDÃO et al., 2012). Essa avaliação pode ser feita a partir da contagem de micro-organismos

indicadores, como bactérias aeróbias mesófilas, coliformes a 35°C e coliformes a 45°C (BARROS et al, 2007; PINHEIRO et al, 2010; BRANDÃO et al., 2012). Outra forma é através da pesquisa direta pela identificação de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. (BARROS et al., 2007; BARREIRA, 2009).

### **3.3. Micro-organismos indicadores e *Salmonella* spp. associada a produtos de origem animal**

Os micro-organismos indicadores são utilizados na microbiologia de alimentos como marcadores que refletem as condições gerais de higiene no processo de produção e do produto (CHAPIN et al., 2014). Por terem esta função, a escolha de qual grupo utilizar reflete diretamente na capacidade de inferência sobre origem da contaminação e real impacto sobre a inocuidade e qualidade microbiológica do produto.

Dentre as características importantes de um micro-organismo indicador temos a relação inversa entre a sua quantidade e a qualidade do alimento ou ambiente de manipulação. Neste caso, a ausência ou baixa quantidade do micro-organismo indicaria uma boa qualidade higiênica sanitária do item avaliado, e altas quantidades seriam indicativas de falhas no processo. Recomenda-se também que o micro-organismo indicador tenha origem exclusivamente fecal, porém, que também possa sobreviver no ambiente sem que sofra influência de outros micro-organismos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Apesar de existirem definições claras sobre as características desejadas em um micro-organismo indicador de higiene, encontrar algum que se encaixe perfeitamente em todos os itens é extremamente difícil. Assim, ao utilizar os principais grupos que tem esta função, aeróbios mesófilos, coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli*, é necessário ter conhecimento sobre quais os limites de extrapolações e considerações sobre a contaminação observada que é possível ser feita (EFSA, 2012).

A contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBT) é uma medida muito utilizada quando se pretende avaliar a qualidade geral de vários produtos cárneos ou derivados (CALIXTO et al., 2016; LEIRA et al., 2019). Essa contagem é altamente utilizada na qualificação de leites e também para controle de mastites no rebanho leiteiro da propriedade (RIBAS et al., 2004). Já para a qualidade de carne, não havendo limites descritos na legislação, a CBT pode ser comparada com trabalhos já realizados e também com guias internacionais de segurança alimentar como o *Codex Alimentarius* e o *Food Standards Agency* (CASELANI et al., 2013).

Na União Europeia, diferentemente do Brasil, utiliza-se micro-organismos aeróbios mesófilos como indicadores de higiene do processo de abate para diversas espécies como bovinos, ovelhas, cabras, cavalos e suínos (EU, 2007; BARCO et al., 2015). Por não estar regulamentada pela legislação brasileira, a avaliação deste grupo de micro-organismos é raramente utilizada, pois, não sendo obrigatória, envolve um investimento extra que a empresa opta por não realizar (CAMARGO et al., 2019). Classificam-se como aeróbios mesófilos os micro-organismos que necessitam de oxigênio, que crescem à temperatura de 37°C e que em altas concentrações em produtos cárneos podem provocar o surgimento de superfície escorregadia, alteração da cor, produção de gás, alteração de odor e rancificação da gordura presente (SOHAIB et al., 2016).

Os coliformes por sua vez, são formados por um grupo de micro-organismos aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, gram negativos, não formadores de esporos e capazes de fermentar lactose com a produção de ácido láctico à 32-35°C (DAVIDSON et al., 2004). Inicialmente, neste grupo eram incluídos apenas quatro gêneros de bactérias, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*, e com a evolução na identificação dos micro-organismos, hoje já se sabe que mais de 19 gêneros compõem o grupo sendo a maioria pertencente à família das *Enterobacteriaceae* (PARR, 1938; ABBOTT et al., 2003).

Com o intuito de se aproximar das definições que norteiam os indicadores de higiene, procedeu-se então uma divisão do grupo dos coliformes totais de acordo com a temperatura ideal de crescimento, dando origem a três grupos, dentre eles os coliformes termotolerantes que são capazes de fermentar lactose à 44-45°C. *Escherichia coli* é um dos micro-organismos pertencentes a este grupo e é considerado na literatura como o único indicativo real de contaminação fecal do ambiente ou do alimento (GHAFIR et al., 2008).

*E. coli* é o micro-organismo de escolha quando se tenta avaliar a possível origem fecal da contaminação, pois além da temperatura ideal de crescimento ser próxima à do interior do trato gastrointestinal, sua sobrevivência é ruim fora deste ambiente, não podendo ser considerada, portanto uma contaminação ambiental (MARTIN et al., 2016). Assim, a compreensão do perfil e característica de cada grupo escolhido para indicar o padrão de higiene do objeto de estudo é fundamental para a correta interpretação dos dados e conseqüentemente, a exata fundamentação teórica para as ações de melhorias pretendidas (LECLERC et al., 2001; BUSTA et al., 2006; MARTIN et al., 2016).

Com o surgimento da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) no final da década de 50 e sua ampla divulgação e utilização, muito se evoluiu no controle dos micro-organismos indicadores nas indústrias alimentícias (JENSON; SUMMER, 2012).

Estudos evidenciam que com o bom gerenciamento de perigos e riscos é possível promover a redução substancial da contaminação por indicadores nas mais diversas superfícies de contato com o alimento e nas mais diversas matrizes alimentares (TOMASEVIC et al., 2016).

Na legislação nacional existem padrões microbiológicos com níveis máximos permitidos para a comercialização de diversas carnes. Dentre as bactérias descritas na legislação tem-se limite para *Salmonella* spp., coliformes a 45 °C e estafilococcus coagulase positiva. Para a carne de rã *in natura* temos estabelecido um nível apenas para *Salmonella* spp. e estafilococcus coagulase positivos, sendo ausente em 25g e 10<sup>3</sup> UFC/g ou mL, respectivamente (BRASIL, 2001).

Portanto, apesar do monitoramento feito por micro-organismos indicadores ser uma ferramenta útil, simples e de rápida execução, a identificação e caracterização de patógenos, como *Salmonella*, além de uma demanda legal é uma forma direta de avaliação do risco que a carne de rã representa para os consumidores adeptos deste produto.

Segundo dados do “Center for Disease Control and Prevention”, *Salmonella* é responsável por mais de 1,2 milhões de infecções de origem alimentar ao ano, com 23.000 hospitalizações e 450 mortes (CDC, 2019). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, entre os anos de 2009 e 2018, foram registrados 120.584 casos de pessoas que desenvolveram algum tipo de doença após o consumo de alimentos e dessas, 11,3% tiveram *Salmonella* spp. como causa confirmada (MS, 2019). Este patógeno tem alternado com *Escherichia coli* como o micro-organismo mais associado às doenças de origem alimentar no Brasil, estando também entre os mais importantes em diversos países do mundo (SCALLAN, 2011; FOOD SAFETY BRAZIL, 2017; EFSA, 2019; CDC, 2019).

Estudos têm mostrado que além de aves, bovinos e suínos, normalmente associados a este patógeno, os animais de sangue frio também devem ser considerados importantes reservatórios de *Salmonella* spp., podendo essa bactéria fazer parte da microbiota intestinal desses animais (KOURANY; TELFORF, 1981; ALFANI, 2007; RIBAS; POONLAPHDECHA, 2017). Segundo dados apresentados por Mermin et al. (2004), no final da década de 90, aproximadamente 74.000 infecções em humanos causadas por *Salmonella* nos Estados Unidos tiveram relação com o contato com répteis e anfíbios, e apesar desses números impressionantes, poucos trabalhos estão disponíveis na literatura sobre a incidência desse patógeno na carne de rã-touro (CHAMBERS; HULSE, 2006; ALFANI, 2007).

Uma vez contaminados, diversos trabalhos mostram que os anfíbios podem ser portadores assintomáticos de *Salmonella* spp. sendo, portanto, reservatórios com potencial risco a saúde pública (BARTLETT; TRUST; LIOR, 1977; GEUE; LOSCHNER, 2002;

MAHAJAN et al., 2003; PFLEGER et al., 2003; CLARKSON et al., 2010; YANG et al., 2015).

Kia et al. (2018) analisaram 202 amostras de rãs comercializadas para consumo na Nigéria, 10,9% amostras foram positivas para *Salmonella*. Ribas e Poonlaphdecha (2017) encontraram uma prevalência de 69,07% de *Salmonella* em 97 amostras de rãs na Tailândia, e alertaram para o risco à saúde pública pelo consumo da carne. Dos oitos sorovares isolados por esses pesquisadores, seis (Hvittingfoss, Newport, Panamá, Stanley, Thompson e Wandsworth) já foram relatados em humanos na Tailândia, indicando uma possível transmissão de *Salmonella* de rãs para humanos.

Corroborando com esse fato, Chambers e Hulse (2006) mostram que os sorovares mais comumente isolados de anfíbios foram *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, que por sua vez são os principais responsáveis pelas infecções em humanos (MERMIM et al., 2004).

De acordo com resolução publicada pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) é estabelecido que *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, carnes de animais aquáticos são geralmente consumidas com pouca cocção, e diferentemente do que acontece com o consumo de outras carnes como o frango, a temperatura pode não ser um fator importante na redução ou eliminação deste micro-organismo (GAMA, 2001).

Devido à importância já apresentada do gênero *Salmonella* spp. para a saúde pública e suas diversas rotas de contaminação da carcaça e produto final, é imprescindível a utilização de ferramentas eficazes na identificação deste patógeno e suas características como a presença de genes relacionados à patogenicidade e resistência a antimicrobianos (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012). Além disso, ferramentas específicas podem ser utilizadas para associar com precisão os mesmos agentes patogênicos presentes em alimentos e os causadores de enfermidades em humanos, sendo importantes para que medidas preventivas e corretivas sejam realizadas, a fim de se evitar novos casos e surtos (ICMSF, 2006).

Uma das técnicas que auxiliam no entendimento epidemiológico do agente patogênico é o PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), podendo ser utilizada no monitoramento de surtos, na identificação e controle de cepas patogênicas, além da identificação da fonte de infecção. Essa técnica é considerada o método padrão-ouro para tipagem de *Salmonella*, devido sua acurácia e reprodutibilidade (BOONMAR et al., 1998; GUERRA et al., 2000; BOPP et al., 2016). De acordo com Struelens, De Ryck e Deplano (2001), o PFGE serve para

se realizar mapeamento físico de cromossomos, para acompanhamento da evolução de clones bacterianos em um determinado habitat e para estudos taxonômicos.

### **3.4. Genes de virulência em *Salmonella* spp.**

Os genes de virulência determinam a patogenicidade da *Salmonella*, ou seja, a capacidade da bactéria em causar doença. Esses genes estão relacionados a características essenciais à patogenicidade da bactéria, como a habilidade de invasão, fixação, multiplicação e a sobrevivência do patógeno na célula do hospedeiro (OCHOA; RODRÍGUES, 2005; VIEIRA, 2009). A capacidade da *Salmonella* em 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, entre outras (OCHOA; RODRÍGUEZ, 2005; ZHANG, 2015).

Segundo Rhen e Dorman (2005), a variedade de hospedeiros da *Salmonella* pode ser devido ao conjunto de genes de virulência, que auxiliam a bactéria na sua sobrevivência no organismo do hospedeiro. Portanto, o estudo dos genes de virulência ajuda na compreensão do potencial da *Salmonella* em causar uma infecção, e assim criar medidas para controlar a sua sobrevivência no hospedeiro.

Os genes que codificam os fatores de virulência podem estar localizados em elementos genéticos transmissíveis, como os *transposons*, plasmídeos ou bacteriófagos, assim como também fazer parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria, as chamadas de Ilhas de Patogenicidade (GALDINO et al., 2013). Há cinco Ilhas de Patogenicidade em *Salmonella*, a maioria dos genes está localizada nessas ilhas, e esses genes podem ter sido adquiridos por incorporação de materiais genéticos de outras bactérias (FERREIRA; CAMPOS, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Alguns fatores de virulência estão associados a fímbrias, que são filamentos de adesão da bactéria na célula do hospedeiro, além de ser responsável por formação de biofilme (BISHOP; DOUGAN; BAKER, 2006; GIBSON et al., 2007; BORGES et al., 2013). Existem diferentes tipos de fímbrias, as mais estudadas são: fímbria polar longa (*Long Polar Fimbriae*–LPF), fímbrias agregativas (*Aggregative fimbriae* – AGF), fímbrias do tipo I (Fim) e fímbrias codificadas por plasmídeos (*Plasmid Encoded Fimbriae*–PEF) (DARWIN; MILLER, 1999). A fímbria polar longa (*operon lpfA*) é a mais longa, está localizada polarmente na bactéria e é codificado pelo gene *lpfA*. O *operon lpfA* está presente somente no gênero *Salmonella*, mas pode não estar presente em todos os sorovares. Esse *operon* está

ligado à capacidade de adesão da *Salmonella* às células M do intestino e pode conferir imunidade cruzada entre diferentes sorovares de *Salmonella* (NORRIS; BÄUMLER, 1999).

O operon *sef* possui quatro genes (*sefABCD*), que são necessários para translocação e formação da fimbria SEF14, sendo esta fundamental para a aderência ou sobrevivência da bactéria em macrófagos. O gene *sefA* codifica a maior subunidade da proteína SefA (uma das quatro subunidades proteicas da SEF14), e além de estar associado com a produção da fimbria, esse gene também está envolvido com a adesão do patógeno à região da placa de Peyer no intestino delgado (MIRMOMENI; KIANI; SISAKHTNEZHAD, 2008; LIU et al., 2011).

Na ilha de patogenicidade 1 estão localizados os genes de invasão (*inv*), que são responsáveis pela internalização da bactéria pela célula do hospedeiro, podendo também causar apoptose em macrófagos infectados. O gene *invA*, que codifica a proteína InvA da membrana interna da bactéria, é fundamental para invasão das células epiteliais do hospedeiro (GROISMAN; OCHMAN, 1997; FERREIRA; CAMPOS, 2008; WHANG et al., 2009). Ainda na ilha de patogenicidade 1, o gene *sopB* codifica a proteína SopB, apesar de ainda ser pouco definido a função desse proteína acredita-se que a mesma altera o equilíbrio iônico causando a secreção de fluidos resultando em diarreia, e também pode estar envolvida no recrutamento de neutrófilos (PRAGER et al., 2000; KHOO et al., 2015)

Os plasmídeos de virulência possuem uma região genômica quem contém o *locus spv*, (*Salmonella* plasmid virulence) composto por cinco genes *spv* RABCD, essa região pode promover o crescimento e sobrevivência da bactéria no hospedeiro. O gene *spvB* provoca a desestabilização do citoesqueleto das células e apoptose em macrófagos no hospedeiro (HUR et al., 2011; RODICIO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

O gene *pagC* está relacionado a sobrevivência da bactéria dentro dos macrófagos e a resistência a pH baixo e a antimicrobianos (MILLER et al., 1992). O gene *rpoS* também é responsável pela sobrevivência da bactéria no hospedeiro, contra condições de estresse como pH baixo (LEE et al., 1995; ABDULLAH; MACKKEY; KARATZAS, 2017). A CDT (toxina de distensão citoletal) induz a apoptose das células do hospedeiro e prolonga a persistência da bactéria no hospedeiro. CDT possui três subunidades: *cdtABC*, sendo *cdtB* a forma ativa, essa quando atinge o núcleo da célula do hospedeiro provoca rupturas no DNA (OHARA et al., 2004; MEZAL; BAE; KHAN, 2014).

### 3.5. Resistência a antimicrobianos de *Salmonella* spp.

Os antimicrobianos são usados para inibir a multiplicação (bacteriostático) ou causar a morte (bactericida) da bactéria. Quando se alcança esse objetivo, podemos dizer que o micro-organismo é sensível ao antibiótico. Mas quando o micro-organismo multiplica-se ou sobrevive a doses terapêuticas de determinado agente antimicrobiano dizemos que ele é resistente ao medicamento (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Micro-organismos multirresistentes são resistentes a três ou mais classes destes medicamentos, que agem em alvos celulares diferentes (SHRESTHA et al., 2017). Sorovares como *S. Enteritidis* (CARDOSO et al., 2006), *S. Thyphimurium* (RIBOT et al., 2002) e também *S. Hadar* (CRUCHAGA et al., 2001) têm sido identificados como multirresistentes à antimicrobianos, um problema ainda maior para a saúde pública.

A resistência pode ser derivada de modificações na estrutura da bactéria, como alteração no material genético, ou por aquisição de material genético de fontes externas (ambiente, vírus ou outras bactérias) (FIOCRUZ, 2018). O uso indiscriminado de antibióticos tanto na medicina humana quanto na veterinária, tem levado ao surgimento de cepas de bactérias mais resistente a várias classes de antibióticos, sendo isso um grave problema na saúde pública (ZIMERMAN, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) emitiu em 2017 um alerta sobre a necessidade de se criar novos antibióticos para combater bactérias patogênicas que representam uma ameaça para a saúde humana, antes que acabem as opções de tratamento, pois muitas dessas bactérias já são resistentes a vários antimicrobianos. A OMS classificou os patógenos de acordo com a espécie e o tipo de resistência, em três níveis prioritários: crítico, alto e médio. A *Salmonella* spp. foi classificada no nível alto, devido a sua resistência a fluoroquinolonas (OPAS, 2017).

Na veterinária o uso de antibióticos é realizado para tratamento e controle de doenças, e como promotores de crescimento. Porém, o uso indiscriminado na produção de animais destinados a alimentação humana pode ser responsável pelo surgimento de cepas de *Salmonella* resistentes, gerando um problema no momento da escolha do antibiótico durante um tratamento clínico humano, além de elevar os gastos com tratamentos e aumentar os índices de mortalidade (FIOCRUZ, 2015).

A Instrução Normativa nº26 regulamenta a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de antimicrobianos de uso veterinário para garantir o uso correto desses medicamentos. Ainda estabelece que os antibióticos pertencentes às classes dos

anfenicóis, tetraciclina, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas devem ser de uso exclusivo em produtos antimicrobianos de uso veterinário, sendo vedada a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

Vários países já diminuíram ou até mesmo proibiram o uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais produtores de alimento. A União Europeia é um exemplo desses países que optaram pela proibição, e isso se estende para a importação de carnes também, afetando a produção brasileira já que a UE é um dos nossos principais importadores de carne. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, deve ser reduzido o uso de todas as classes de antibióticos de importância médica em animais produtores de alimentos, sendo necessária a restrição total desses medicamentos na promoção do crescimento e na prevenção de doenças sem diagnóstico (ONU, 2017).

Os antibióticos ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol são utilizados para tratamento inicial de salmonelose. *Salmonella* spp. resistente a pelo menos três classes de agentes antimicrobianos são considerados resistentes a múltiplos fármacos, a infecção causada por esse sorotipo é normalmente tratada com quinolonas e cefalosporinas de terceira geração (KARON et al., 2007; ENG et al., 2015).

El-Sharkawy et al. (2017) avaliaram a suscetibilidade a antibióticos de sorovares *Salmonella enterica* isoladas de propriedades de frangos de corte no Egito, durante 2014-2015, e encontraram taxa de sensibilidade à gentamicina, trimetoprim/sulfametoxazol e estreptomicina de 100, 94,8 e 89,7%, respectivamente. Thung et al. (2016) analisaram a sensibilidade a antibióticos de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* isolados de amostras de carne de frango crua vendidas em mercados na Malásia. Todos os isolados foram resistentes à eritromicina, penicilina e vancomicina, os isolados resistentes a múltiplos fármacos apresentaram resistência a pelo menos três antibióticos (eritromicina, penicilina e vancomicina).

Nguyen et al. (2016) examinaram amostras de carne crua (bovina, suína e aves) e frutos do mar (camarão e peixes de água doce), recolhidos entre 2012 e 2015 em matadouros e mercados no Vietnã. Os isolados de *Salmonella* tiveram prevalência alta de resistência a antimicrobianos, particularmente a tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol. Dos isolados 41,1% apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. Não se tem informações na literatura sobre o uso de antibióticos na ricultura, mas com a intensificação dos sistemas de criação de rãs deve-se ficar atento ao possível uso dessas drogas.

Mesmo em face das inúmeras particularidades da ranicultura é marcante a escassez de estudos que considere pontos básicos da cadeia de produção como a falta de informações sobre a qualidade higiênica dos produtos ofertados ao consumidor e o papel das etapas do abate sobre essa qualidade (AYRES et al., 2015). Trabalhos que abordem outros temas além da área específica do processamento de subprodutos com a carne de rã tenderão a colaborar com a fidelização do consumidor e rompimento de barreiras criadas pela flutuação do preço da carne e resistências alimentares ditadas por hábitos e costumes (CARRARO, 2008; FAO, 2010; MOREIRA, 2011; YANG et al., 2015).

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.W.; JANDA, J.M. The genus aeromonas: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2348–2357, 2003. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2348-2357.2003>

ABDULLAH, W.W.; MACKEY, B.; KARATZAS, K.G. Biofilm formation of *Salmonella* enterica and the central role of *rpoS* sigma factor in stress resistance. **Malaysian Applied Biology**, v. 46, n. 3, p. 59-65, 2017.

AFONSO, A.M. Ranicultura se consolida com cadeia produtiva operando em rede interativa. **Visão Agrícola**, n. 11, p. 33-35, 2012.

AFONSO, A.M.; ALMEIDA, P.C.; BRAVO, S.A.C.; ARAÚJO, J.V.A.; MÁRSICO, E.T.; CONTE-JÚNIOR, C.A.; FREITAS, M.Q.; MANO, S.B. Bullfrog tad poles slaughtering methodology to obtain tail fillet sand non-edibleby-products. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 23, n. 1-2, p. 104-108, 2016. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2016.039>

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.

ALTHERR, S.; GOYENECHEA, A.; SCHUBERT, D.J. 2011. **Canapés to extinction: The international trade in frog’s legs and its ecological impact**. (Eds). Munich (Germany), Washington, D.C. (USA), p. 20.

AYRES, A.A.C., DAMASCENO, D.Z., MORO, E.B., MACCARI, G.M.R., NERVIS, J.A.L., BITTENCOURT, F. Carcass yield and proximate composition of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, n.37, v.4, p.329-333, 2015. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v37i4.28196>

BARCO, L.; BELLUCO, S.; ROCCATO, A.; RICCI, A. A systematic review of studies on *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* on Beef carcasses at the slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 30-39, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.027>

BARREIRA, V.B. **Análise bacteriológica da carne de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) comercializada no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Fluminense – Faculdade Veterinária. 2009.

BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; MONTEIRO, A.A.; BELOTI, V. Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 27, v. 4, p. 856-862, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400028>

BARTLETT, K.H.; TRUST, T.J.; LIO, H. Small Pet Aquarium Frogs as a Source of *Salmonella*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1026-1029, 1977. <https://doi.org/10.1128/AEM.33.5.1026-1029.1977>

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O.C. 2009. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. et al (Ed.). **Doenças das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 435-454.2ed.

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. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511525360.006>

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.

BOONMAR, S., BANGTRAKULNOTH, A., PORNRUNANGWONG, S., TERAJIMA, J., WATANABE, H., KANEKO, K.I., OGAWA, M. Epidemiology analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from human and broiler chickens in Thailand by phage typing and pulsed field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 971 – 974, 1998. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.4.971-974.1998>

BOPP, D.J.; BAKER, D.J.; THOMPSON, L.; SAYLORS, A.; ROOT, T.P.; ARMSTRONG, L.; MITCHELL, K.; DUMAS, N.B.; MUSSER, K.A. Implementation of *Salmonella* Serotype Determination Using Pulsed-field Gel Electrophoresis in a State Public Health Laborator. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.85, n.4, p. 416-418, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.023>

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; BORSOI, A.; MORAES, H.L.S.; CARLOS T.P. SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, V.P. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.12, p.1416-1422, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200004>

BRANDÃO, J.L.; GUIRRO, E.C.P.; PINTO, P.S.A.; NERO, L.A.; PINTO, J.P.A.N. BERSOT, L.S. Monitoramento de micro-organismos indicadores de higiene em linha de abate de bovinos de um matadouro-frigorífico habilitado à exportação no oeste do Paraná. **Semina: Ciência Agrárias**, v.33, n.2, p.755–762, 2012. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n2p755>

BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** – RIISPOA. Aprovado pelo Decreto 30.691 de 29/03/1952. Brasília, 1952.

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. ANVISA. Resolução RDC nº. 12, 02 de Janeiro de 2001. Estabelece Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2001. Seção 1, p. 45-53.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da pesca. **Brasil: Grandes regiões e unidades da federação**. Brasília: IBAMA, p.113. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009**, Brasília, p. 1 – 9. 2009.

BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** – RIISPOA. Decreto Nº 9.013 de 29 de março de 2017, Brasília, 2017.

- BUSTA, F.F.; SUSLOW, T.V.; PARISH, M.E.; BEUCHAT, L.R.; FARBER, J.N.; GARRETT, E.H.; HARRIS, L.J. The use of indicators and surrogate microorganisms for the evaluation of pathogens in fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, n. 2, p. 179–185, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00035.x>
- CALIXTO, F.A.A.; MACHADO, E.S.; FRANCO, R.M.; MESQUITA, E.F.M. Avaliação bacteriológica da carne de bijupirá fresca, salgada e defumada proveniente de cultivo da baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro. **Boletim do Instituto Pesca**, São Paulo, v. 42, n.1, p. 209 – 215, 2016. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n1p209>
- CAMARGO, A.C.; COSSI, M.V.C.; SILVA, W.P.; BERSOT, L.S.; LANDGRAF, M.; BARANYI, J.; FRANCO, B.D.G.; NERO, L.A. **Microorganisms**, v.7, n.86, p.1-11, 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030086>
- CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A.M.M.; FALCÃO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 254 – 264, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.008>
- CAPUANO, F.; MANCUSI, A.; CAPPARELLI, R.; ESPOSITO, S.; PROROGA, Y.T.R. Characterization of Drug Resistance and Virulotypes of *Salmonella* Strains Isolated from Food and Humans. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 1 – 6, 2013. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1511>
- CARDOSO, M.O.; RIBEIRO, A.R.; SANTOS, L.R.; PILOTTO, F.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; ROCHA, S.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, Passo Fundo, v.37, p.299-302, 2006.
- CARDOSO, E.S.; ROCHA, H.M.O.; FURLAN, M.C. A piscicultura no município de Santa Maria, RS. **Ciência e Natura**, v. 31, n. 1, p. 131 – 140, 2009.
- CARRARO, K.C. Ranicultura: um bom negócio que contribui para a saúde. **Revista Da FAE**, v.11, n.1, p.111-118, 2008.
- CARRAMIÑANA, J.J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 1-2, p. 133-139, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.08.010>
- CASALI, A.P.; MOURA, O.M.; LIMA, S.L. Rações comerciais e o rendimento de carcaça e subprodutos de rã-touro. **Ciência Rural**, v.35, n.5, p.1172-1178, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000500029>
- CASELANI, K; PRATA, L.F.; PRATA, C.B.; BIZARI, P.A.; PEREIRA, G.T. Relação entre os controles de APPC, programa de redução de patógenos e qualidade da carne no abate de bovinos: um ano de pesquisa em um abatedouro-frigorífico de exportação brasileiro. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 108, p. 29 – 38, 2013.
- CDC – Centers of Disease Control and Prevention. **Salmonella**. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 01 abril 2019.

CHAMBERS, D.L.; HULSE, A.C. *Salmonella* Serovars in the Herpetofauna of Indiana County, Pennsylvania. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3771–3773, 2006. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3771-3773.2006>

CHAPIN, T.K.; NIGHTINGALE, K.K.; WOROBO, R. W.; WIEDMANN, M.; STRAWN, L. K. Geographical and meteorological factors associated with isolation of *Listeria* species in New York State produce production and natural environments. **Journal Food Protection**, n. 77, p. 1919–1928, 2014. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-132>

CLARKSON, L.S.; TOB IN-D'ANGELO, M.; SHULER, C.; HANNA, S.; BENSON, J.; VOETSCH, A.C. Sporadic *Salmonella enterica* serotype Javiana infections in Georgia and Tennessee: a hypothesis-generating study. **Epidemiology and Infection**, v. 138, p. 340–346, 2010. <https://doi.org/10.1017/S0950268809990586>

COSSI, M.V.C.; BURIN, R.C.K.; CAMRAGO, A.C.; DIAS, M.R.; LANNA, F.G.P. A.; PINTO, P.S.A.; NERO, L.A. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. **Food Control**, v. 40, p.320-323, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.018>

CRIBB, A.Y; AFONSO, A.M.; MOSTÉRIO, C.M.F. **Manual técnico de ranicultura**. Embrapa, ed.1. Brasília, DF, 2013.

CRUCHAGA, S.; ECHEITA, A.; ALADUEÑA, A.; GARCÍA-PENA, J.; FRIAS, N.; USERA, MA. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, n.3, p.315-321, 2001. <https://doi.org/10.1093/jac/47.3.315>

DAVIDSON, P.M.; ROTH, L.A.; AND GAMBREL-LENARZ, S.A. 2004. Coliform and other indicator bacteria. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17th Edn, eds H. M. Wehr and J. F. Frank (Washington, DC: American Public Health Association), p. 187–227, 2004. <https://doi.org/10.2105/9780875530024ch07>

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.3, p.405-428, 1999. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.3.405>

EFSA – European Food Safety Authority. 2012. Scientific Opinion of the EFSA Panels on Biological Hazards (BIOHAZ), on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), and on Animal Health and Welfare (AHAW) on the public health hazards to be covered by inspection of meat (poultry). **EFSA Journal**, v. 10, n. 274, p. 1–179, 2012. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2741>

EFSA - European Food Safety Authority. 2019. *Salmonella*. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>>. Acesso em: 2 abril 2019.

EL-SHARKAWY, H.; TAHOUN, A.; EL-GOHARY, A.E.A.; EL-ABASY, M.; EL-KHAYAT, F.; GILLESPIE, T.; KITADE, Y.; HAFEZ, H.M.; NEUBAUER, H.; EL-ADAWY, H. Epidemiological, molecular characterization and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovars isolated from chicken farms in Egypt. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 8, p.1-12, 2017.

ENG, S.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, N.A.; SER, H.; CHAN, K.; LEE, L. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284-293, 2015. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>

EU. Commission Regulation (EC) No 1441/2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal European Union**, v. 332, p. 12–29, 2007.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fisheries and Aquaculture Department**. Cultured Aquatic Species Information Programme: *Rana catesbeiana*. 2013.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nation. 2010. **Fishery and Aquaculture Statistics**. 2008/ FAO annuaire. Rome: FAO. 72p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/015/ba0058t/ba0058t.pdf>>. Acesso em: 01 abril 2019.

FERREIRA, E.O.; CAMPOS, L.C. *Salmonella*. 2008. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, p. 329-338.

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

FIOCRUZ. **Fundação Oswaldo Cruz**. 2015. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/pesquisadora-fala-sobre-resistencia-causada-pelo-uso-indiscriminado-de-antibioticos>>. Acesso em: 19 abril 2019.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Cartilha alerta para os riscos da resistência aos antibióticos. 2018. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/cartilha-alerta-para-os-riscos-da-resistencia-aos-antibioticos>>. Acesso em: 19 abril 2019.

FOOD SAFETY BRAZIL. **Surtos Alimentares no Brasil – Dados Atualizados em maio de 2017**. 2017. Disponível em: <<https://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-maio-de-2017/>>. Acesso em: 2 abril 2019.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

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, L.T. Modelos Mistos em Melhoramento Animal. **Curso Iberoamericano de Actualización en Técnicas de mejora genética de razas locales**. Lisboa - Portugal, 2001.

GEUE, L.; LOSCHNER, U. *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 1-2, p. 79-91, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00437-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00437-0)

GHAFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. **Journal Food Protection**, v.71, p. 35 – 45, 2008. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.1.35>

- GIBSON D.L.; WHITE A.P.; RAJOTTE C.M.; KAY W.W. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 1131-1140, 2007. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/000935-0>
- GROISMAN, E.A.; OCHMAN, H. How Salmonella became a pathogen. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 343 – 349, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01099-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01099-8)
- GUERRA, B., SCHRORS, P., MENDOZA, M.C. Application of PFGE performed with XbaI to an epidemiological and phylogenetic study of *Salmonella* serotype Typhimurium. Relations between genetic types and phage types. **The New Microbiologica**, v. 23, n. 1, p. 11–20, 2000.
- HUR, J.; KIM, J.H.; PARK, J.H.; LEE, Y.; LEE, J.H. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. **The Veterinary Journal**, v.189, p.306-311, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.07.017>
- HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J.H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 819 – 830, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.014>
- ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microbial ecology of foods**. Food commodities. New York: Academic Press, 1980.
- ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. A simplified guide to understanding and using food safety objectives and performance objectives. 2006.
- JENSON, I.; SUMMER, J. Performance standards and meat safety – developments and direction. **Meat Science**, v.92, n.3, p.260-266, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.015>
- 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. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101995000200007>
- KARON, A.E.; ARCHER, J.R.; SOTIR, M.J.; MONSON, T.A.; KAZMIERCZAK, J.J. Human multidrug-resistant *Salmonella* newport infections, Wisconsin, 2003–2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1777–1780, 2007. <https://doi.org/10.3201/eid1311.061138>
- KHOO, C.H.; SIM, J.H.; SALLEH, N.A.; CHEAH, Y.K. Pathogenicity and phenotypic analysis of *sopB*, *sopD* and *pipD* virulence factors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Agona. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 107, p.23–37, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0300-7>
- KIA, G.S.N.; BENJAMIN, E.A.; AJANI, E.O.; OTOLORIN, G.R. Occurrence of *Salmonella* and *Shigella* in edible frogs (*Hoplobatrachus* spp.) from Hanwa Frog market Zaria, Nigeria. **Sokoto Journal of Veterinary Sciences**, v. 16, n. 2, 2018. <https://doi.org/10.4314/sokjvs.v16i2.10>
- KOURANY, M.; TELFORD, S.R. Lizards in the Ecology of Salmonellosis in Panama. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1248-1253, 1981. <https://doi.org/10.1128/AEM.41.5.1248-1253.1981>

- LECLERC, H.; MOSSEL, D.A.; EDBERG, S.C.; STRUIJK, C.B. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 201–234, 2001. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.201>
- LEE, I.S.; LIN, J.; HALL, H.K.; BEARSON, B.; FOSTER, J.W. The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v.17, p. 155-167, 1995. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\\_17010155.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010155.x)
- LEIRA, M.H.; NASCIMENTO, A.F.; ALVES, F.R.; ORFAO, L.; LACERDA, Y.G.; BOTELHO, H.A.; REGHIM, L.; LAGO, A.A. Characterization of different techniques for obtaining minced fish tilapia waste. **Food Science and Technology**, 2019. <https://doi.org/10.1590/fst.37517>
- LIMA, S.L. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Editora Folha de Viçosa. 1999.
- LIMA, S.L. **Curso Criação de rãs: Novas tecnologias**. Viçosa: CPT, 260p., 2012.
- LIU, B.; ZHANG, L.; ZHU, X.; SHI, C.; CHEN, J.; LIU, W.; HE, X.; SHI, X. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.010>
- LÓPEZ-LUNA, J.; VÁSQUEZ, L.; TORRENT, F.; VILARROEL, M. Short-term fasting and welfare prior to slaughter in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v.400, n.401, p.142-147, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.009>
- MAHAJAN, R.K.; KHAN, S.A.; DINESH SINGH CHANDEL, D.S.C.; KUMAR, N.; HANS, C.; CHAUDHRY, R. Fatal Case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Gastroenteritis in an Infant with Microcephaly. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5830–5832, 2003. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5830-5832.2003>
- MARTIN, N.H.; TRMCIC, A.; HSIEH, T.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n. 1549, p. 1-8, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01549>
- MENDES, A.A. Jejum pré-abate em frangos de corte. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 3, p. 199-209, 2001. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2001000300001>
- MERMIN, J.; HUTWAGNER, L.; VUGIA, D.; SHALLOW, S.; DAILY, P.; JEFFREY BENDER, J.; KOEHLER, J.; MARCUS, R.; ANGULO, F.J. **Reptiles, Amphibians, and Human Salmonella Infection: A Population-Based, Case-Control Study, Reptiles, Amphibians, and Salmonella**, Suppl 3, 2004. <https://doi.org/10.1086/381594>
- MEZAL, E.H.; BAE, D.; KHAN, A.A. Detection and functionality of the CdtB, PltA, and PltB from *Salmonella enterica* serovar Javiana. **Pathogens and Disease**, v. 72, p. 95-103, 2014. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12191>
- MILLER, V.L.; BEER, K.B.; LOOMIS, W.P.; OLSON, J.A.; MILLER, S.I. An Unusual *pagC*: *TnphoA* Mutation Leads to an Invasion and Virulence-Defective Phenotype in *Salmonellae*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 9, p. 3763-3770, 1992. <https://doi.org/10.1128/IAI.60.9.3763-3770.1992>

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, p.1497-1501, 2008. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1497.1501>

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](http://cn.staging.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/Manejo-de-pr-abate-em-frangos-de-corte.pdf)>. Acesso em: 05 de jun. 2018.

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.

MOREIRA, C.R. **Análise econômica da ricultura: viabilidade individual e integrada de operações**. Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento. 2011.

MS – Ministério de Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, Informe 2018. 2019. Secretária de Vigilância, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis – Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, 2019.

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. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402014000200023>

NGUYEN, D.T.A.; KANKI, M.; NGUYEN, P.D.; THILE, H.; NGO, P.T.; TRAN, D.N.M.; LE, N.H.; DANG, C.V.; KAWAI, T.; KAWAHARA, R.; YONOGLI, S.; HIRAI, Y.; JINNAI, M.; YAMASAKI, S.; KUMEDA, Y.; YAMAMOTO, Y. Prevalence, antibiotic resistance, and extended-spectrum and AmpC $\beta$ -lactamase productivity of *Salmonella* isolates from raw meat and seafood samples in Ho Chi Minh City, Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p.115-122, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.017>

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. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13393>

OCHOA, I.M.F.; RODRIGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidade *Salmonella* sp. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.47, n.1-2, p.25-42, 2005.

OHARA, M.; OSWALD, E.; SUGAI, M. Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus. **Journal Biochemistry**, v. 136, p. 409–413, 2004. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh154>

OLIVEIRA, S.D, SIQUEIRA, F.F; SANTOS, L.R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal Food Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 297-305, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.022>

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

ONU. Nações Unidas Brasil. **OMS recomenda suspensão do uso de antibióticos para estimular crescimento de animais.** 2017. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-recomenda-suspensao-do-uso-de-antibioticos-para-estimular-crescimento-de-animais/>>. Acesso em: 19 abril 2019.

OPS – Brasil. Organização Pan-Americana de Saúde. 2017. **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente.** Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812)>. Acesso em: 24 março 2017.

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.

PARR, L.W. Coliform intermediates in human feces. **Journal of Bacteriology**, v.36, p. 1–15, 1938. <https://doi.org/10.1128/JB.36.1.1-15.1938>

PFLEGER, G.; BENYR, G.; SOMMER, R.; HASSL, A. Pattern of *Salmonella* excretion in amphibians and reptiles in a vivarium. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 206, n. 1, p. 53 – 59, 2003. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00184>

PINHEIRO, M.B.; WADA, T.C.; PEREIRA, C.A.M. Análise microbiológica de tábuas de manipulação de alimentos de uma instituição de ensino superior em São Carlos, SP. **Revista Simbio-Logias**, v.3, n.5, 2010.

PRAGER, R.S.; MIROLD, E.; TIETZE, U.; STRUTZ, B.; KNUPPEL, W.; RABSCH, W.D.; HARDT, H.; TSCHAPE. Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. **International Journal Medical Microbiology**, n. 290, p. 605–617, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80009-0)

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.11.004>

RIBAS, N.P.; HARTMANN, W.; MONARDES, H.G.; ANDRADE, U.V.C. Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 2343-2350, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000900021>

RIBAS, A.; POONLAPHDECHA, S. Wild-Caught and Farm-Reared Amphibians are Important Reservoirs of *Salmonella*, A Study in North-East Thailand. **Zoonoses and Public Health**, v.64, n. 2, p. 106-110, 2017. <https://doi.org/10.1111/zph.12286>

RIBOT, E.M.; WIERZBA, R.K.; ANGULO, F.J.; BARRET, T.J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. **Emerging Infectious Diseases**, n. 4, v. 8, p. 387-391, 2002. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010202>

- RODICIO, M.R.; HERRERO, A.; RODRIGUEZ, I.; GARCIA, P.; MONTERO, I.; BEUTLICH, JANINE.; RODICIO, R. GUERRA, B.; MENDOZA, M.C. Acquisition of antimicrobial resistance determinants of virulence plasmids by specific serotypes of *Salmonella enterica* nontyphoid. **Microbiologia Médica**, v.22, n.3, p.55-65, 2011. <https://doi.org/10.1097/MRM.0b013e328346d87d>
- SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.A.; ROY, S.L.; JONES, J.L.; GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 7–15, 2011. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- SHRESTHA, A. BAJRACHARYA, A.; SUBEDI, H.; TURHA, R.; KAFLE, S.; SHARMA, S.; NEUPANE, S.; CHAUDHARY, D.; Multi-drug resistance and extended spectrum beta lactamase producing Gram negative bacteria from chicken meat in Bharatpur Metropolitan, Nepal. **BioMed Central Research Notes**, v. 10, n. 574, p. 1 – 5, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2917-x>
- 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. <https://doi.org/10.5935/1981-2965.20160060>
- SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Brasil é o segundo na produção mundial de rãs**. 2013. Disponível em: <<http://sna.agr.br/brasil-e-segundo-na-producao-mundial-de-ras/>>. Acesso em: 15 maio 2018.
- SOHAIB, M.; ANJUM, F.M.; ARSHAD, M.S.; RAHMAN, U.U. Postharvest intervention Technologies for safety enhancement of meat and meat based products: a critical review. **Journal of Food Science and Technology**, v.53, n.1, p.19-30, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1985-y>
- 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. <https://doi.org/10.5935/1981-2965.20160007>
- 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. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141369>
- STRUELENS, M.; DE RYCK, R.; DEPLANO, A. 2001. **Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing**. In: New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data. L. Diikshoorn, K.J. Towner, M. Struelens, Eds., Elsevier: New York, PP. 159 – 176. <https://doi.org/10.1016/B978-044450740-2/50008-3>
- TEIXEIRA, D. Mercado internacional de ancas de ranas. **Globefish/FAO**, v.68, n.1, p.44. 2002.
- THUNG, T.Y.; MAHYUDIN, N.A.; BASRI, D.F.; RADZI, C.W.J.W.M.; NAKAGUCHI, Y.; RADU, M.N.S. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in raw chicken meat at retail markets in Malaysia. **Poultry Science**, v. 95, n. 8, p. 1888-1893, 2016. <https://doi.org/10.3382/ps/pew144>

TOMASEVIC, I.; KUZMANOVIC, J.; ANDELKOVIC, A.; SARACEVIC, M.; STOJANOVIC, M.M.; DJEKIC, I. The effects of mandatory HACCP implementation on microbiological indicators of process Hygiene in meat processing and retail establishments in Serbia. **Meat Science**, v. 114, p. 54-57, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.008>

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª. ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 760 p. 2008.

VIEIRA, M.A. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406 – 414, 2009.

ZIMERMAN, R.A. **Uso Indiscriminado de Antimicrobianos e Resistência Microbiana**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos/MS. Ministério da Saúde. 2010.

ZHANG, H.; MA, X.; LIU, Y.; DUAN, N.; WU, S.; WANG, Z.; XU, B. Gold nanoparticles enhanced SERS aptasensor for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 872-877, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.033>

WHANG, Y.P.; LIA, L.; SHENA, J.Z.; YANG, 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.07.012>

WPSA. Sociedade Mundial de Proteção Animal. **Abate Humanitário de Suíno**. Rio de Janeiro: LCM Comunicações. 132p, 2010.

YANG, X.; WU, Q.; ZHANG, J.; HUANG, J.; CHEN, L.; LIU, S.; YU, S.; CAI, S. Prevalence, enumeration, and characterization of *Salmonella* isolated from aquatic food products from retail markets in China. **Food Control**, v. 57, p. 308 – 313, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.046>

## **CAPÍTULO 2**

**INFLUÊNCIA DO JEJUM PRÉ-ABATE NAS CONTAGENS DE MICRO-  
ORGANISMOS INDICADORES E PRESENÇA DE *Escherichia coli* E *Salmonella* spp.  
EM CARÇAÇAS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

**Influênciado jejum pré-abate nas contagens de micro-organismos indicadores e presença de *Escherichia coli* E *Salmonella* spp. em carcaças de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**

Priscila Cristina Costa, Marcus Vinícius Coutinho Cossi

**RESUMO**

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência de quatro tempos de jejum pré-abate (0, 24, 48 e 72 horas) na contaminação microbiológica em carcaças de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*), abatidas em um abatedouro frigorífico de Uberlândia-MG. As amostras, obtidas por meio de enxágue da carcaça, foram coletadas em dois pontos do processo de abate: A - após a sangria e B - após a toaleta final. Foram realizadas análises para contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBT), coliformes a 35°C e presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. A identificação de *Salmonella* spp. seguiu a ISO 6579 e a confirmação foi feita por PCR (gene *ompC*). As amostras confirmadas como *Salmonella* foram submetidas à avaliação de presença de genes de virulência e teste de sensibilidade a dez antimicrobianos por disco-difusão. As contagens foram comparadas por Kruskal-Wallis e as frequências por teste de Fisher ( $P < 0,05$ ). Para contagens de CBT, 72 horas de jejum reduziu a contaminação das carcaças no ponto B quando comparada com os períodos de 0 e 24 horas, obtendo valores médios de 2,59 ( $\pm 1,12$ ), 3,65 ( $\pm 1,74$ ) e 3,73 ( $\pm 0,79$ ) log UFC/g respectivamente ( $P < 0,05$ ). Para presença de *E. coli*, o maior período de jejum resultou em carcaças com baixa ocorrência deste microrganismo, variando na etapa A do abate de 80% (0 horas) à 26,7% (72 horas) e na etapa B de 60% (24 horas) à 13,3% (72 horas). Comportamento semelhante foi observado para *Salmonella* spp, sendo que na etapa A houve variação de 20% de positividade (0 horas) à 3% (48 horas) e na etapa B de 17% (0 horas) à 0 (72 horas). Das amostras confirmadas como *Salmonella* spp., 53,33% foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. A cefalexina, ampicilina e tobramicina provocaram sensibilidade em todas as amostras. Houve 100% de positividade para os genes *sopB*, *spaN*, *msgA*, e *iroN*, 93,3% das amostras foram positivas para o gene *invA*, 83,3% para *pagC* e 73,3% para *lpfA*. Com esses resultados podemos concluir que o jejum de 72 horas foi o mais adequado para obtenção de um produto menos contaminado. Além disso, presença de cepas de *Salmonella* spp. positivas para vários genes de virulência

eresistentes a alguns antibióticos, alerta para a necessidade de medidas de controle higiênico sanitárias em todo o processo produtivo de rã.

**Palavras-chave:** Abate de rãs. Coliformes a 35°C. Genes de virulência. Qualidade microbiológica. Resistencia a antibióticos. Salmonelose.

**Influence of pre-slaughtering fast on the counts of microorganisms indicating hygiene and the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in bullfrog carcasses (*Lithobates catesbeianus*)**

**ABSTRACTS**

The objective of the work was to evaluate the influence of four times of pre-slaughter fasting (0, 24, 48 and 72 hours) on microbiological contamination in carcasses of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*), slaughtered in a slaughterhouse in Uberlândia-MG. The samples, obtained by rinsing the carcass, were collected at two points in the slaughter process: A - after bleeding and B - after the final toilet. Analyzes were performed to count mesophilic aerobic heterotrophic bacteria (CBT), coliforms at 35 ° C and the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. The identification of *Salmonella* spp. followed ISO 6579 and confirmation was made by PCR (*ompC* gene). Samples confirmed as *Salmonella* were submitted to the evaluation of the presence of virulence genes and sensitivity test to ten antimicrobials per disk-diffusion. The counts were compared by Kruskal-Wallis and the frequencies by Fisher's test ( $P < 0.05$ ). For CBT counts, 72 hours of fasting reduced the contamination of carcasses at point B when compared with the periods of 0 and 24 hours, obtaining average values of 2.59 ( $\pm 1.12$ ), 3.65 ( $\pm 1.74$ ) and 3.73 ( $\pm 0.79$ ) log UFC/g respectively ( $P < 0.05$ ). For the presence of *E. coli*, the longest period of fasting resulted in carcasses with low occurrence of this microorganism, varying in step A of slaughter from 80% (0 hours) to 26.7% (72 hours) and in step B of 60% (24 hours) to 13.3% (72 hours). Similar behavior was observed for *Salmonella* spp, and in step A there was a 20% positive variation (0 hours) at 3% (48 hours) and in step B by 17% (0 hours) at 0 (72 hours). Samples confirmed as *Salmonella* spp., 53.33% were sensitive to all tested antimicrobials. Cephalixin, ampicillin and tobramycin caused sensitivity in all samples. There was 100% positivity for the *sopB*, *spaN*, *msgA*, and *iroN* genes, 93.3% of the samples were positive for the *invA* gene, 83.3% for *pagC* and 73.3% for *lpfA*. With these results we can conclude that the 72 hour fast was the most adequate to obtain a less contaminated product. In addition, the presence of strains of *Salmonella* spp. positive for several virulence genes and resistant to some antibiotics, warns of the need for sanitary hygienic control measures in the entire frog production process.

**Key-words:** Slaughter of frogs. Coliforms at 35 ° C. Virulence genes. Microbiological quality. Antibiotics resistance. Salmonellosis.

## 1. INTRODUÇÃO

A carne de rã é muito consumida em países como França e Estados Unidos, e apesar de ainda ser pouco expressivo o seu consumo no Brasil, tem mostrado crescimento nos últimos anos (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013; LIMA; CRUZ; MOURA, 1999). *Lithobates catesbeianus* é a espécie de rã utilizada na ranicultura brasileira, e mesmo sendo exótica se adaptou muito bem as condições do país, apresentando uma ótima produção (FERREIRA; FRANÇA; DIA, 2009).

A legislação brasileira estabelece diretrizes acerca de inspeção de anfíbios, que são classificados, segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), como pescados (BRASIL, 2017). Mesmo tendo sido incluídos detalhes no Decreto nº 9013 de 2017, ainda faltam informações em relação ao abate de rãs, como o tempo de jejum pré-abate, etapa muito importante para evitar a contaminação da carcaça durante o abate e conseqüentemente produzir um alimento inócuo (BRASIL, 2017).

Um dos principais pontos de contaminação da carcaça dentro na linha de abate é a evisceração, pois nesse momento pode ocorrer ruptura das vísceras causando contaminação da carcaça com conteúdo intestinal (BOLTON; DOHERTY; SHERIDAN, 2001; MENDES, 2001; LANA et al., 2018). Neste contexto, o jejum pré-abate é necessário para ocorrer o esvaziamento do intestino do animal e reduzir as chances de contaminação (WALL, 2001; LANA et al., 2018). Caso não seja respeitado o período necessário para este esvaziamento, ou até mesmo se for feito um período maior do que o ideal, as chances de rompimento são maiores e a carcaça fica exposta à contaminação de origem entérica (ICMSF, 1980; BONESI; SANTANA, 2008; RUI; ANGRIMANI; SILVA, 2011).

Uma das formas de avaliar a qualidade microbiológica de carnes é quantificar micro-organismos indicadores, como bactérias mesófilas e enterobactérias. Esses micro-organismos podem estar presentes no ambiente ou no intestino dos animais e do homem e, portanto, podem ser usados como indicativos de falha no processamento e possível contaminação fecal (SERRAINO et al., 2012). Além disso, a presença destes micro-organismos pode indicar a presença de bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp., que também habita o trato intestinal dos animais e é um dos patógenos mais associados às doenças de origem alimentar (BUCHANAN, 2000; SERRAINO et al., 2012).

*Salmonella* spp. é uma bactéria comumente associada a surtos alimentares em todo mundo. São reconhecidos mais de 2600 sorovares de *Salmonella*, todos potencialmente patogênicos (EFSA, 2014). A pesquisa por genes de virulência oferece um potencial do dimensionamento da patogenicidade dos isolados de *Salmonella* spp. associados com alimentos (CAPUANO et al., 2013; YANG et al., 2015). Além disso, avaliar a resistência a antibióticos é fundamental para se estimar o risco para a saúde pública, já que nos últimos anos, muitas cepas isoladas de *Salmonella* spp. têm se mostrado resistentes a diversos agentes antimicrobianos (CARRAMIÑANA; ROTA; HERRERA, 2004; HUR; JAWALE; LEE, 2012; VAN et al., 2012; COSSI et al., 2014; YANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Assim, este trabalho teve como objetivo comparar o impacto de diferentes períodos de jejum pré-abate (0, 24, 48 e 72 horas) na contagem de micro-organismos indicadores e presença de *E. coli* e *Salmonella* spp. em carcaças de rã-touro abatidas em um estabelecimento localizado em Uberlândia-MG, Brasil.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Caracterização do local de coleta**

A coleta das amostras foi realizada durante os anos de 2017 e 2018 em um frigorífico experimental da Universidade Federal de Uberlândia-MG, Brasil. O sistema de criação é fechado, ou seja, toda a produção das rãs é realizada nesse local, desde a fase de girino até a fase adulta, incluindo a reprodução e o abate. As rãs são alimentadas com ração para peixes e são abatidas com idade entre quatro e seis meses, e com peso médio aproximado de 350 gramas. O abate é realizado por dois funcionários e as etapas do processo são: insensibilização (eletroanestesia), sangria, esfolagem, evisceração, toaleta e resfriamento. Todas as etapas de manejo pré-abate até a operação de insensibilização e sangria, seguem o conjunto de diretrizes técnicas e científicas que garantem o bem-estar animal (BRASIL, 2000). O estabelecimento segue os requisitos gerais de higiene e boas práticas de elaboração para alimentos elaborados/industrializados para consumo humano, dispostos na Portaria nº 368 de 1997 e atualmente está em processo de autorização para realização de abate comercial sob fiscalização do serviço de inspeção municipal (SIM) (BRASIL, 1997).

## 2.2. Coleta das amostras

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) conforme protocolo nº 026/17. Foram utilizados 140 animais, todos foram retirados do mesmo recinto e apresentavam padronização de tamanho e estavam saudáveis, sem fraturas ou feridas.

Os animais foram alocados em tanques separados de acordo com a hora de jejum pré-abate ao qual seriam submetidos, que eram: 0 horas, 24 horas, 42 horas e 72 horas. Para cumprir o período de jejum as visitas foram feitas em dias sequenciais e a coleta foi realizada em dois momentos do processo de abate: ponto A (após a sangria) e ponto B (após a toailete). Para o jejum zero os animais foram abatidos imediatamente após o trato realizado no início da manhã.

As amostras foram obtidas pela técnica de enxágue, onde cada carcaça era imersa em sacolas estéreis contendo 100 mL de solução de NaCl 0,85% estéril, e massageava-se o conjunto (carcaça e solução) durante 30 segundos, antes da retirada da carcaça (CASON et al. 2006, adaptado). Após a coleta, as amostras eram mantidas refrigeradas em isopor com gelo até a chegada ao laboratório para ser realizadas as análises. Em cada ponto (A e B) as carcaças eram pesadas individualmente em balança manual para correta análise dos dados de contagem feitos neste estudo.

## 2.3. Análise microbiológica

As amostras foram analisadas logo quando chegavam ao Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV-UFU), seguindo os procedimentos padrões para a identificação microbiológica.

### *Contagem de Indicadores e identificação de Escherichia coli*

Para pesquisa de micro-organismos indicadores foram coletadas amostras de 76 animais (19 para cada grupo de jejum). Foram realizadas diluições seriadas das amostras em tubos com salina peptonada (0,1%). Para bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas as amostras foram homogeneizadas com PCA (Plate Count Agar) em placas

de petri estéreis e incubadas a 37°C, por 48 horas. A contagem foi feita em placas contendo de 25 a 250 colônias, e para o resultado final foi feita a média das contagens das diluições dentro do intervalo pré-definido e o valor ajustado levando em consideração o peso (gramas) das carcaças. Para este ajuste utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{ml}}{p/c}$$

$$g = \text{UFC/g}$$

$$\text{mL} = \text{UFC/mL}$$

$p$  = peso da carcaça no ponto avaliado

$c$  = volume de 100 mL constante no saco de enxágue

Para a contagem de coliformes a 35°C e *Escherichia coli* as amostras foram inoculadas em placas Petrifilm™ EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A faixa de contagem total em Petrifilm é de 15 a 150 colônias, foram consideradas como coliformes a 35°C as colônias vermelhas e colônias azuis com produção de gás, e apenas as colônias azuis com produção de gás como sendo *E. coli*. As contagens obtidas também foram ajustadas levando em consideração o peso (gramas) das carcaças conforme descrito anteriormente.

#### *Identificação de Salmonella spp.*

Para pesquisa de *Salmonella* spp. foram coletadas amostras de 140 animais (jejum 0 = 35 animais; jejum 24h = 34, jejum 48h = 36; jejum 72h = 35). Para isso, 30 mL de cada homogenato das amostras foram transferidos para um frasco estéril contendo 30 mL de salina peptonada em concentração dupla, sendo incubados em estufa a 37°C/24 horas (CASON et al., 2006, adaptado).

O isolamento de *Salmonella* spp. foi realizado seguindo os padrões internacionais de identificação, ISO 6579 (ISO 2002). Para isso, 30 ml de cada homogenato das amostras foram transferidos para um frasco estéril contendo 30 ml de salina (0,75%) peptonada 2%, resultando assim em um volume final de 60 ml de salina peptonada à 1%, sendo os frascos incubados em estufa a 37°C/24 horas (CASON et al., 2006, adaptado). Após este período, uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo contendo 10 mL de caldo de enriquecimento seletivo Selenito Cistina (Oxoid) e 0,1 ml para tubo

contendo 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis (Oxoid), 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 Shigella (Oxoid) e Ágar XLD (Ágar de desoxicolato-lisina-silose, Oxoid), sendo as placas incubadas 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 0,9 mL do caldo para microtubos (duplicatas) e adicionar 0,1 mL de glicerol em cada microtubo, sendo realizado o congelamento da amostra para posterior confirmação por metodologia molecular. As amostras foram reativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) para realização do PCR (Polymerase Chain Reaction).

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

Para a realização do PCR, as colônias suspeitas isoladas foram submetidas à extração e purificação de DNA, utilizando o Kit de purificação Wizard Genomic DNA (Promega Corp., Madison, WI). Foram preparadas reações com volume total de 25 µL, sendo 2 µL de DNA da amostra, 400 nmol de cada primer (gene *ompC*: *ompC*-F 5'-ATCGCTGACTTATGCAATCG-3' e *ompC*-R 5'-CGGGTTGCGTTATAGGTCTG-3), GoTaq Green conforme recomendações do fabricante e água livre de nucleasse até completar o volume. 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 em gel de agarose 1,5%, cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi usada como controle positivo, água ultrapura no controle negativo e marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder 100 pbKasvi®), o gel foi posteriormente corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, S33111) e observado em transiluminador. As

amostras que apresentaram banda correspondente a 204 pares de base foram consideradas positivas para *Salmonella* spp.

### *Genes de virulência*

Os isolados confirmados como *Salmonella* foram submetidos a protocolos de PCR para identificação de genes de virulência. Os primers utilizados nos protocolos para os genes *sopB*, *spaN*, *spvB*, *orgA*, *pagC*, *msgA*, *iroN*, *cdtB*, foram descritos por Skyberg et al. (2006), para gene *invA* os primers foram descritos por Swamy et al. (1996), para *sefA* por Oliveira et al. (2003) e para *lpfA* por Heuzenroeder, Murray e Dalcin (2000).

Para a realização das análises de reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes de virulência foi utilizado como controle positivo a cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076. As reações de PCR foram realizadas a partir de um volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA da amostra, 2,5 µL de tampão 10X, 0,75 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 µL de 10 pmol/µL da sequência *forward* e *reverse* de cada *primer* (Invitrogen®), 0,25 µL de 20 mM do *mix* de dNTPs (Invitrogen®), 0,25 µL de Taq (5U/µL) (Invitrogen®) e 17,75 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese e foram corados e visualizados. Produtos de PCR de 284 pb (*invA*), 250 pb (*lpfA*) e 488 pb (*sefA*), 220pb (*sopB*), 504pb (*spaN*), 717pb (*spvB*), 255pb (*orgA*), 454pb (*pagC*), 189pb (*msgA*), 1205pb (*iroN*), 268pb (*cdtB*) foram considerados positivos para cada gene rastreado.

### *Resistência antimicrobianos*

A susceptibilidade das cepas confirmadas de *Salmonella* spp aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco difusão, utilizando protocolo recomendado pelo *Clinicaland Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). A escolha dos antimicrobianos baseou-se na utilização dessas drogas na medicina veterinária e humana e ocorrência de resistência em ambas as áreas. Os antimicrobianos testados foram: Azitromicina 15 mcg (AZI), Tobramicina 10 mcg (TOB), Cefalotina 30 mcg (CFL), Ampicilina 10 mcg (AMP), Cefalexina 30 mcg (CFE), Neomicina 30 mcg (NEO), Meropenem 10 mcg (MER), Ciprofloxacina 5 mcg (CIP), Cefotaxima 30 mcg (CTX) e Ceftriaxona 30 mcg (CRO). As zonas de inibição foram medidas e

classificadas como resistentes (parcial foi considerado como total) ou sensíveis ao antimicrobiano de acordo com recomendações do CLSI (2013). A cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como cepa controle da qualidade dos testes de sensibilidade.

## 2.4. Análise de dados

Os resultados de indicadores foram expressos em  $\log_{10}$  UFC/g. Para comparar contagens microbiológicas obtidas nas etapas A e B foi utilizado o teste Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ). Para comparar as médias de contaminação obtidas em cada jejum analisado foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e posteriormente o teste Dunn ( $P < 0,05$ ). Por fim, as comparações de frequências de ocorrência de *E. coli* e *Salmonella* foram feitas pelo teste exato de Fisher ( $P < 0,05$ ). Os resultados de presença de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos foram analisados por estatística descritiva simples. Toda análise estatística foi realizada no programa Graph Pad InStat.

## 3. RESULTADOS

As contagens médias de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBT) nos diferentes tempos de jejum (0, 24, 48 e 72 horas) e nos dois pontos de coleta do abate (A e B) estão representadas na tabela 1. Não foi observado impacto do período de jejum na contagem de CBT na etapa A do abate ( $P > 0,05$ ). No ponto B, o jejum de 72 horas resultou em uma contaminação de carcaça menor que aquelas submetidas aos jejuns de 0 e 24 horas ( $P < 0,05$ ). Nota-se ainda que a contaminação na etapa B do abate para as carcaças submetidas aos jejuns 24 e 48 horas foram superiores à contaminação encontrada na etapa A ( $P < 0,05$ )

**Tabela 1.** Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (log UFC/gramas) em amostras de carcaças de rês-touro em diferentes tempos de jejum pré-abate e coletadas em dois pontos do processo de abate em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG.

Período de Jejum	n	Pontos do Abate	
		A	B
0	15	3,37( $\pm 1,03$ ) <sup>a,A</sup>	3,65( $\pm 1,74$ ) <sup>a,A</sup>
24	15	2,63( $\pm 1,27$ ) <sup>a,A</sup>	3,73( $\pm 0,79$ ) <sup>a,B</sup>
48	15	2,95( $\pm 0,90$ ) <sup>a,A</sup>	3,42( $\pm 0,81$ ) <sup>a,b,B</sup>
72	15	2,94( $\pm 1,07$ ) <sup>a,A</sup>	2,59( $\pm 1,12$ ) <sup>b,A</sup>
Total	60	2,97( $\pm 1,09$ ) <sup>A</sup>	3,35( $\pm 1,24$ ) <sup>B</sup>

\*letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma coluna; \*\*letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma linha.

Já na avaliação de contagens de coliformes a 35°C não foram identificadas diferenças

entre os jejuns e entre os pontos A e B do abate (tabela 2) ( $P > 0,05$ ). Apesar de ter sido identificada a presença deste grupo de microrganismo em 95% (114/120) das amostras analisadas, nota-se que as médias de contagens foram baixas, sendo que em 90 amostras a contagem foi inferior a  $1 \log_{10}$  UFC/g.

**Tabela 2.** Contagem de coliformes a 35°C (log UFC/g) em amostras de carcaças de rês-touro, em diferentes tempos de jejum e em dois pontos da linha de abate em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG.

Período de Jejum	n	Pontos do Abate	
		A	B
0	15	1,27(1,08) <sup>a,A</sup>	0,85(0,67) <sup>a,A</sup>
24	15	0,70(0,70) <sup>a,A</sup>	0,74(0,58) <sup>a,A</sup>
48	15	0,60(0,55) <sup>a,A</sup>	0,65(0,54) <sup>a,A</sup>
72	15	1,08(0,94) <sup>a,A</sup>	0,73(0,72) <sup>a,A</sup>
Total	60	0,91(0,86) <sup>A</sup>	0,74(0,62) <sup>A</sup>

\*letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma coluna; \*\*letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma linha.

Assim como para coliformes a 35°C, na avaliação do impacto do jejum sobre a presença de *Escherichia coli* em carcaças de rês-touro (tabela 3), não houve diferença entre os pontos A, após a sangria, e B, após a toailete. Entretanto, ao comparar os tempos de jejum nota-se que, assim como para CBT, o período de 72 horas foi responsável por uma contaminação menor da carcaça.

**Tabela 3.** Frequência de *Escherichia coli* em amostras de carcaças de rês-touro, em diferentes períodos de jejum e em dois pontos de coleta no abate (ponto A: após sangria e ponto B: após a toailete), em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG.

Período de Jejum	n	Ponto do abate			
		A		B	
		Positivos	%	Positivos	%
0	15	10	66,7 <sup>a</sup>	5	33,3 <sup>a,b</sup>
24	15	4	26,7 <sup>a,b</sup>	7	46,7 <sup>a</sup>
48	15	6	40 <sup>a,b</sup>	5	33,3 <sup>a,b</sup>
72	15	3	20 <sup>b</sup>	1	6,7 <sup>b</sup>
Total	60	23	38,3 <sup>A</sup>	18	30 <sup>A</sup>

\*letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma coluna; \*\*letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma linha.

Ao avaliar a ocorrência de *Salmonella* spp. em 140 carcaças observou-se não haver diferença entre os dois pontos de abate analisados com uma frequência média no ponto A de 8,5% e no ponto de B de 7,8% (Tabela 4). O jejum 0 horas apresentou um maior número de amostras positivas para o patógeno na etapa A do abate em relação ao jejum de 48 horas ( $P < 0,05$ ). No ponto B o patógeno não foi identificado no grupo submetido a 72 horas de privação de comida, sendo estatisticamente diferente da ocorrência observada no jejum de 0 horas ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Frequência de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças de rês-touro, em diferentes períodos de jejum pré-abate e em dois pontos no abate (ponto A: após sangria e ponto B: após a toailete), em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia.

Tempo de Jejum	n	Ponto A		Ponto B		Total
		Positivo	%	Positivo	%	
0	35	7 <sup>a,A</sup>	20,0	6 <sup>a,A</sup>	17,1	13/70 <sup>a</sup>
24h	35	2 <sup>a,b,A</sup>	5,7	4 <sup>a,b,A</sup>	11,4	6/70 <sup>a,b</sup>
48h	35	1 <sup>b,A</sup>	2,8	1 <sup>a,b,A</sup>	2,8	2/70 <sup>b</sup>
72h	35	2 <sup>a,b,A</sup>	5,7	0 <sup>b,A</sup>	0	2/70 <sup>b</sup>
Total	140	12	8,5 <sup>A</sup>	11	7,8 <sup>A</sup>	

\*letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma coluna; \*\*letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma linha.

Os resultados de resistência antimicrobiana das amostras confirmadas como *Salmonella* spp. estão apresentados na tabela 5. A maioria das amostras (53,33%) foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Todos os isolados (100%) foram sensíveis a cefalexina, ampicilina e tobramicina. Um isolado apresentou perfil de multirresistência ( $\geq 3$  classes de antimicrobianos).

Na tabela 6 estão representados a frequência dos genes de virulência dos isolados de *Salmonella* spp. Todos os isolados (100%) apresentaram os genes *sopB*, *span*, *msgA*, e *iron*, 93,3% das amostras foram positivas para o gene *invA*, 83,3% para *pagC* e 73,3% para *lpfA*.

Na tabela 6 estão representados a frequência dos genes de virulência dos isolados de *Salmonella* spp. Todos os isolados (100%) apresentaram os genes *sopB*, *span*, *msgA*, e *iron*, 93,3% das amostras foram positivas para o gene *invA*, 83,3% para *pagC* e 73,3% para *lpfA*.



Tabela 6. Perfil de virulência de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de rês-touro, em dois pontos no abate (ponto A: após sangria e ponto B: após a toalette), em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia.

Animal	Amostra	Ponto de coleta	Genes de Virulência*							
			<i>invA</i>	<i>lpfA</i>	<i>sopB</i>	<i>span</i>	<i>pagC</i>	<i>msgA</i>	<i>iron</i>	<i>rpoS</i>
1	1R	Ponto I	+	+	+	+	+	+	+	+
	2R	Ponto I	+	+	+	+	+	+	+	+
	3R	Ponto I	+	+	+	+	+	+	+	+
2	4R	Ponto II	+	+	+	+	-	+	+	+
	5R	Ponto II	+	+	+	+	+	+	+	+
	6R	Ponto II	+	+	+	+	+	+	+	+
3	7R	Ponto I	+	+	+	+	+	+	+	+
	8R	Ponto I	+	+	+	+	+	+	+	+
4	9R	Ponto II	+	+	-	-	-	-	-	-
5	10R	Ponto I	+	+	+	+	+	+	+	+
	11R	Ponto I	+	+	+	+	-	+	+	+
	12R	Ponto I	+	+	+	+	+	+	+	+
6	13R	Ponto II	+	-	+	+	+	+	+	+
	14R	Ponto II	+	+	+	+	+	+	+	+
7	78R	Ponto II	+	+	+	+	+	+	+	+
8	79R	Ponto I	+	+	+	+	+	+	+	+
9	81R	Ponto I	+	-	+	+	+	+	+	+
10	85R	Ponto II	+	-	+	+	-	+	+	+
11	103R	Ponto II	+	+	+	+	+	+	+	+
	105R	Ponto II	-	+	+	+	+	+	+	+
12	113R	Ponto I	+	-	+	+	+	+	+	+
	114R	Ponto I	-	-	+	+	+	+	+	+
14	124R	Ponto II	+	-	+	+	+	+	+	+
15	140R	Ponto I	+	-	+	+	-	+	+	+
16	142R	Ponto I	+	-	+	+	-	+	+	+
17	150R	Ponto I	+	+	+	+	+	+	+	+
18	151R	Ponto II	+	+	+	+	+	+	+	+
	152R	Ponto II	+	+	+	+	-	+	+	+
	153R	Ponto II	+	+	+	+	+	+	+	+
19	155R	Ponto II	+	+	+	+	+	+	+	+
	156R	Ponto II	+	+	+	+	+	+	+	+

\* Os genes *sef A*, *cdrB*, *orgA* e *spvB* foram negativos em todos os isolados testados e não foram incluídos na tabela

#### 4. DISCUSSÃO

As variações observadas nas contagens de CTB entre as carcaças avaliadas e entre os pontos de abate mostram a importância de cada etapa antes e durante o processamento (Tabela 1). A correta realização do jejum e o treinamento dos colaboradores podem contribuir com a redução da contaminação final da carcaça, já que muitos micro-organismos podem estar aderidos à pele de anfíbios ou presentes no sistema digestivo

desses animais (PESSIER, 2002; CULP; FALKINHAM; BELDEN, 2007; WALKE et al., 2014). Em relação à contaminação inicial dos animais deve-se levar em consideração a forma de criação das rãs, principalmente a higienização do local e a qualidade da água que é utilizada na criação, pois bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas são comumente encontradas no ambiente (JAY, 2005).

Os animais analisados neste trabalho são oriundos de sistemas de criação alagado, ou seja, são criados em baias inundadas que mesmo com troca de água constante, contribui para a contaminação cruzada da pele dos animais (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013). Portanto, ressalta-se a importância de boas práticas de manejo na ricultura para que a contaminação inicial no abate diminua, e por consequência haja menor chance de contaminação da carcaça ou produto final (CARDOZO, 2014).

No ponto B, etapa após a realização da evisceração, é um dos pontos mais críticos do abate, já que durante a retirada das vísceras estas podem se romper e contaminar a carcaça com seu conteúdo (JAY, 2005). No abate de grandes animais realiza-se a oclusão do reto com o intuito de evitar o extravasamento do conteúdo intestinal, entretanto, para animais pequenos como frango, peixes e rãs, não há esta prática (BRASIL, 2017). Nas rãs a evisceração é realizada pelo método de arrancamento manual das vísceras no sentido cloaca-cabeça.

A legislação brasileira não estabelece um limite de contaminação por bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em carne de rã (BRASIL, 2001). A Comissão Nacional de Normas e Padrões Alimentares (CNMPS) descreve como valor padrão para bactérias aeróbias mesófilas de  $10^5$  UFC/g para pescados crus, frescos, refrigerados ou congelados (ABIA, 1985). A FAO (Food and Agriculture Organization) estabelece o valor de  $5,0 \times 10^5$  UFC/g como o máximo de contaminação aceitável (SHRIVASTAVA, 1986). Sendo assim, as contagens encontradas nas carcaças de rãs abatidas neste estabelecimento para CTB foram consideradas adequadas, não havendo nenhuma com contagem superior à preconizada.

No presente trabalho foi observado que no ponto A os períodos de jejum não influenciaram as contagens de CBT e coliformes a 35°C (tabela 1 e 2). Mesmo os animais tendo sido retirados do ambiente comum de produção e alocados em um ambiente novo e com água limpa, isso não foi suficiente para a redução destes micro-organismos. Este benefício poderia ter sido observado se somado à alocação em local limpo fosse realizada uma limpeza mecânica dos animais antes do início do abate, para retirada de restos de fezes, urina e como um processo inicial de desinfecção da pele, para reduzir a carga microbiana (LIMA; CRUZ; MOURA, 1999; RAMOS, 2004). No entanto, mesmo sem esta limpeza mecânica, este período em baias novas e com água limpa foi suficiente para a redução na identificação de *Escherichia coli* no ponto A do abate das rãs (tabela 3).

Considerando a etapa B, foi possível identificar redução para bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (tabela 1) e presença de *Escherichia coli* (tabela 3) com o aumento dos tempos de jejum pré-abate. Para ambos os micro-organismos, com 72 horas de jejum foi possível identificar diferença estatística entre os valores. Nos trabalhos científicos publicados sobre o abate de rã-touro, são usados tempo de jejum de 24 a 48 horas, mas não é avaliado o impacto do jejum sobre a inocuidade da carne (ALFANI, 2007; BRASIL, 1998; FILHO, 2009).

Assim, com os resultados encontrados neste trabalho pode-se observar que do ponto de vista microbiológico o tempo de jejum de 24 ou 48 horas não são suficientes para reduzir as contagens CBT ou a ocorrência de *E. coli*. Considerando que *E. coli* está presente no intestino de rãs-touro, é preciso atenção durante a evisceração dos animais e com a limpeza da carcaça após essa etapa, para que se mitigue a contaminação da carcaça por estes micro-organismos (CARR et al., 1976; GRAY et al., 2007). Gray et al. (2007) em experimento com rãs-touro, inocularam nos girinos por via oral *Escherichia coli* O157:H7, produtora da Shiga toxina que pode causar a Síndrome hemolítico-urêmica em humanos. Após 14 dias, mais da metade dos animais foram positivos para o patógeno, sugerindo que rãs-touro são hospedeiros adequados para *E. coli* O157:H7.

Como apresentado na tabela 4, o jejum também influenciou a ocorrência de *Salmonella* spp. no início do abate, ponto A, e no final do abate, ponto B. A ausência de jejum (0 horas) implicou na maior quantidade de amostras positivas para *Salmonella* spp. (ponto A: 20%, ponto B: 17%) e o período de 72 horas de jejum na redução da contaminação das carcaças, chegando a não haver amostra contaminada no ponto B (ponto A: 6%, ponto B: 0%).

Semelhante ao observado para *E coli*, os resultados obtidos no ponto A indicam que a alocação dos animais em uma baía limpa é importante para a redução da contaminação externa da carcaça (RIBAS; POONLAPHDECHA, 2016; DADIÉ et al., 2017; CDC, 2018). Na etapa B o melhor resultado foi obtido com 72 horas e isso pode ser devido a menor carga microbiana intestinal resultado do tempo de jejum que o animal foi submetido (MENDES, 2001; SCHETTINO et al., 2006).

Não há na literatura trabalhos sobre jejum pré-abate e sua relação com a contaminação microbiana em carcaças de rãs-touro, o que impede a comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com outros achados semelhantes. Bermejo-Poza et al. (2017) avaliaram a influência de diferentes tempos de jejum pré-abate em trutas, e semelhante ao observado para rãs, o esvaziamento intestinal completo ocorreu após 4 dias de jejum (72 horas). Apesar de não ter sido foco do presente trabalho, outras variáveis podem ser levadas em consideração na discussão sobre o tempo ideal de jejum como, o impacto sobre o peso da carcaça ou a logística necessária para se alcançar 72 horas de jejum.

Independente do jejum pré-abate, a frequência de *Salmonella* spp. encontrada neste trabalho, nas carcaças de rãs-touro destinadas ao consumo é preocupante. Dadié et al. (2017), realizaram estudo na Costa do Marfim com 210 amostras de carne fresca de rãs, e encontraram 11,4% de positividade para *Salmonella* spp. Em pesquisa realizada no Brasil, no Rio de Janeiro, por Barreira et al. (2011), 10% de 30 carcaças de rã congeladas vendidas no mercado foram positivas para *Samonella* spp. Estas frequências de positividade para o patógeno são superiores a muitos estudos com carne de frango, bovino e suíno e mostram a necessidade de tecnificação do processo e elaboração de legislações específicas que dêem suporte à cadeia produtiva (BONESI; SANTANA 2008).

Dos dez antibióticos testados, três (cefalexina, ampicilina e tobramicina) provocaram sensibilidade em todas as cepas de *Salmonella* spp. isoladas neste trabalho, e um isolado apresentou perfil de multirresistência ( $\geq 3$  classes de antimicrobianos) (tabela 5). Não há na literatura trabalhos específicos sobre resistência a antibióticos de cepas de *Salmonella* spp. isoladas em carcaças de rãs no abate.

Alguns trabalhos relatam a transmissão de *Salmonella* ao homem através do contato direto ou indireto com animais exóticos de companhia, como os répteis (CARVALHO, 2016; TORREJÓN, 2016). Por isso, Carvalho (2016) avaliou a prevalência de *Salmonella* sp. em várias espécies de répteis de companhia (ofídios,

sáurios e quelónios), e as amostras isoladas foram submetidas a testes de sensibilidade a 12 antibióticos (amicacina, gentamicina, amoxicilina + ácido clavulânico, penicilina, cloranfenicol, ácido nalidixico, ciprofloxacina, enrofloxacina, cefotaxima, tetraciclina e sulfametoxazole-trimetoprim). Todas as amostras testadas foram resistentes a dois antibióticos, gentamicina e ciprofloxacina, e seis isolados apresentaram perfis de multirresistência.

De acordo com o relato de Braun et al. (2015), em um caso de gastroenterite por *Salmonella* spp. em lactentes associados ao contato com tartarugas em Santiago-Chile, as três cepas isoladas foram sensíveis à ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol. Torrejón (2016) em estudo com cepas isoladas de répteis em cativeiro, realizado no Chile, ao avaliar a resistência a quatro antibióticos (estreptomocina, tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol), todas as cepas foram sensíveis a tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol, para estreptomocina todas as cepas foram resistentes.

Zeng et al. (2019) avaliou 672 amostras de carne fresca de porco, frango e pato, em varejos na China. Os 92 isolados foram testados a resistência para 18 antibióticos, todos os isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico. Mori et al. (2017), avaliou a sensibilidade a 12 antibióticos de *Salmonella* isoladas de amostras de carnes de aves, no Japão. Todos os isolados foram suscetíveis à ciprofloxacina, diferente do nosso trabalho em que esse agente antimicrobiano apresentou resistência a maior quantidade de isolados. As maiores taxas de resistência foram contra tetraciclina, estreptomocina e canamicina.

Apesar da falta de informações referentes a resistência à antibióticos de isolados de *Salmonella* em carcaças de rãs, com os resultados encontrados nesta pesquisa e com os dados apresentados de outros trabalhos, seja com répteis de companhia ou animais de produção, a presença de cepas resistentes e multirresistentes alerta para a necessidade de medidas de controle desse patógeno nos animais e em seus produtos como a carne, devido as consequências para a saúde pública mundial.

Foi pesquisada a presença de doze genes de virulência associados à capacidade de invasão de cepas de *Salmonella* nos isolados deste trabalho. Todos os isolados apresentaram os genes *sopB*, *spaN*, *msgA*, e *iroN*, 93,3% das amostras foram positivas para o gene *invA*, 83,3% para *pagC* e 73,3% para *lpfA*. Nenhum isolado apresentou os genes *sefA*, *spvB*, *orgA* e *cdtB*.

Castro (2015) detectou os genes *invA* em todos os isolados de *Salmonella* spp. de amostras de répteis mantidos em cativeiro, no Chile. Os genes *orgA* e *sopB* foram

encontrados em 47% e 85% das cepas, respectivamente. O autor chama a atenção para a baixa porcentagem de cepas que apresentaram o gene *orgA*, assim como em nosso trabalho nenhum isolado apresentou esse gene. A explicação para isso poderia ser que em répteis a salmonelose se limita a uma infecção intestinal intraluminal. O gene *orgA* está associado na migração transepitelial da *Salmonella*, ainda se sugere que cepas que não possuem esse gene apresentam a capacidade de invasão diminuída.

O gene *sopB* foi detectado em todas os isolados deste trabalho. Outros autores também encontraram uma alta porcentagem desse gene em cepas de *Salmonella* isoladas de variadas fontes, Skyberg et al. (2006) em cepas de aves (99%), Hur et al. (2011) em cepas de leitões (96%) e Dione et al. (2011) em cepas de isolados clínicos humanos e de alimentos (94,1%).

O gene *invA* estava presente em 93,3% dos isolados deste trabalho, resultado semelhante ao encontrado por Galdino et al. (2013) em amostras de aviários de frango de corte, onde 94,4% dos isolados de *Salmonella* apresentaram esse gene. O gene *invA* está associado a invasão nas células epiteliais do hospedeiro.

O gene *spaN* também facilita a entrada da bactéria na célula do hospedeiro (Kim; Lee, 2017), Webber et al. (2019) observou frequência de 81,7% desse gene em carcaças de frangos. O gene *msgA*, associado a sobrevivência intracelular da bactéria, foi encontrado em 100% dos isolados de *Salmonella* em estudo de Webber et al. (2019), assim como em nosso trabalho. O gene *iroN*, associado ao metabolismo de ferro, foi identificado em todas os isolados do nosso trabalho, Webber et al. (2019) encontrou esse gene em um número menor de isolados (88,9%).

Ainda há poucas informações referentes à presença de *Salmonella* em carne de rã-touro, assim também como os sorotipos, a presença de genes de virulência e a resistência à antibióticos dos isolados. Mas os dados encontrados nesta pesquisa permitem uma melhor compreensão das características desses isolados, podendo ajudar no controle de *Salmonella* na produção da carne de rã, evitando sua persistência no produto final.

Além da alta ocorrência de *Salmonella* spp. nas carcaças de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) ser uma preocupação quanto a ingestão direta ou contaminação cruzada associada à manipulação, outra característica do produto torna este um problema ainda maior para a saúde pública. Normalmente o consumo de carne de rã é feito ao ponto ou malpassado e, portanto, a temperatura pode não ser suficiente para reduzir a

contaminação, já que para inativar a *Salmonella* deve-se utilizar temperaturas acima de 70°C (BRASIL, 2011; CDC, 2018).

A presença de cepas resistentes e multirresistentes e a detecção de vários genes de virulência, alerta para a necessidade de medidas de controle desse patógeno nos animais e em seus produtos como a carne, devido as consequências para a saúde pública mundial.

## 5. CONCLUSÃO

Foi possível observar que o jejum pré-abate contribuiu para a redução da contaminação em carcaças de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) e dentre as opções avaliadas o jejum de 72 horas foi o mais eficiente na redução de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. A presença de isolado de *Salmonella* spp. multirresistente e a positividade de vários genes de virulência nas cepas mostra a necessidade de medidas de monitoramento e controle desse patógeno dentro da cadeia de produção da ranicultura.

## REFERÊNCIAS

ABIA – Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos. **Compêndio da legislação de alimentos: consolidação das normas e padrões de alimentos**. São Paulo, 1985. v. 1: Atos do Ministério da Saúde.

ALFANI, R. **Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças e vísceras de rãs (*Ranacatesbiana* – Rã Touro): Avaliação do Processo de Abate**. 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu – SP, Dezembro, 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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.004>

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. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1734-1738.2004>

BARREIRA, V.B.; MESQUITA, E.F.; FRANCO, R.M. Análise bacteriológica de carne de rã-touro (*Litobhates castebeianus*) comercializada no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Higiene alimentar**, v.25, p.145-150. 2011.

BERMEJO-POZA, R.; FUENTE, J.D.L.; PÉREZ, C.; CHAVARRI, E.G.; DIAZ, M.T.; TORRENT, F.; VILLARROEL, M. Determination of optimal degree days of fasting before slaughter in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 473, p. 272-277, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.036>

BOLTON, D.J.; DOHERTY, A.M.; SHERIDAN, J.J. Beef HACCP: intervention and non-intervention systems. **International Journal of Food Microbiology**, n.66, p.119-129, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00528-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00528-6)

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.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n. 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle: APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 fev. 1998. Seção I.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº. 12, 02 de Janeiro de 2001. Estabelece Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2001. Seção 1, p. 45-53.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella***. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60 p.

BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**. Decreto Nº 9.013 de 29 de março de 2017, Brasília, 2017.

BRAUN, S.; SPALLONI, W.; FERRECCIO F.; POSTIGO, J.; FERNÁNDEZ, A.; PORTE, L.; SALDIVIA, A.; WIGANT, W.; TRIANTAFILO, V. Gastroenteritis por *Salmonella* spp. entres lactantes asociada a contacto com tortugas acuáticas. **Revista Chilena Infectología**, v.32, n.3, p.334-338, 2015. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000400013>

BUCHANAN, R.L. Acquisition of microbiological data to enhance food safety. **Journal of Food Protection**, n.63, p.832-838, 2000. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.6.832>

CAPUANO, F.; MANCUSI, A.; CAPPARELLI, R.; ESPOSITO, S.; PROROGA, Y.T.R. Characterization of Drug Resistance and Virulotypes of *Salmonella* Strains Isolated from Food and Humans. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 11 – 6, 2013. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1511>

CARDOZO, M.V. **Deteção de *Escherichia colis* higatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em peixes de pisciculturas e de vida livre**. 2014. 95 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univesidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- Jaboticabal – SP, 2014.

CARR, A.H.; AMBORSKI, R.L.; JUNIOR, D.D.C.; AMBORSKI, G.F. Aerobic bacteria in the intestinal tracts of bullfrogs (*Rana catesbeiana*) maintained at low temperatures. **Herpetologica**, v. 32, n. 3, p. 239-244, 1976.

CARRAMIÑANA, J.J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 1-2, p. 133-139, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.08.010>

CARVALHO, A.C.B. ***Salmonella* sp. em répteis de companhia**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. 2016.

CASTRO, J.E.M. **Presencia de genes de virulência associados a la invasion de enterocitos en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles em cautiverio em laregión metropolitana**. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinarias. 2015.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. ***Salmonella***. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 31 março 2019.

CLSI – Clinical And Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement**. CLSI M100-S23, Wayne, 2013.

COSSI, M.V.C.; BURIN, R.C.K.; CAMRAGO, A.C.; DIAS, M.R.; LANNA, F.G.P. A.; PINTO, P.S.A.; NERO, L.A. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. **Food Control**, v. 40, p.320-323, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.018>

CRIBB, A.Y.; AFONSO, A.M.; MOSTÉRIO, C.M.F. **Manual Técnico de Ranicultura**. Embrapa, ed.1. Brasília, DF, 2013.

CULP, C.E.; FALKINHAM, J.O.; BELDEN, L.K. Identification of the natural bacterial microflora on the skin of eastern newts tadpoles and redback salamanders.

**Herpetologica**, v. 63, p. 66-71, 2007. [https://doi.org/10.1655/0018-0831\(2007\)63\[66:IOTNBM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1655/0018-0831(2007)63[66:IOTNBM]2.0.CO;2)

DADIÉ, A.; BLÉ, Y.C.; KOUADIO-NGBESSO NADÈGE, K.N.; FANTODJI, A.; DJÈ, K.M. Prevalence, serotype and presence of invasion gene in *Salmonella* isolated from frog meat obtained from western region of Côte d'Ivoire. **International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research**, v. 5, n.7, p. 75-81, 2017.

DIONE, M.M.; IKUMAPAYI, U.; SAHA, D.; MOHAMMED, N.I.; ADEGBOLA, R.A.; GEERTS, S.; IEVEN, M.; ANTONIO, M. Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 11, p. 765 – 775, 2011.

<https://doi.org/10.3855/jidc.1512>

EFSA - European Food Safety Authority. 2014. **Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012**. EFSA J. 12:3547.

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547>

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

FILHO, C.B.C.; **Características alimentares e potencial impactante da rã-touro *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802)**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2009.

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.

GRAY, M.J.; RAJEEV, S.; MILLER, D.L.; SCHMUTZER, A.C.; BURTON, E.C.; ROGERS, E.D.; HICKLING, G.J. Preliminary evidence that American Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) are suitable hosts for *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 4066-4068, 2007.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02905-06>

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

HUR, J.; CHOI, Y.; PARK, J.; JEON, B.; LEE, H.; KIM, A.; LEE, J. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.75, n.1, p.49-56, 2011.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microbial ecology of foods**. Food commodities. New York: Academic Press, 1980.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KIM, J.E.; LEE, Y.J.. Molecular characterization of antimicrobial resistant non-typhoidal *Salmonella* from poultry industries in Korea. **Irish Veterinary Journal**, v. 70, n. 20, p. 1- 9, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13620-017-0095-8>

LANA, R.F.; CUNHA, A.F.; SANTOS, L.F.; ARAÚJO, F.R.; SILVA, M.D. Influência do jejum alimentar na mortalidade, perda de peso vivo, fraturas, hematomas e contaminação de carcaças em abatedouros de frangos. **Archives of Veterinary Science**, v.23, n.1, p.24-32, 2018. <https://doi.org/10.5380/avs.v23i1.44731>

LIMA, S.L.; CRUZ, T.A.; MOURA, O.N. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Viçosa: Folha de Viçosa. 1999. 172p.

MENDES, A.A. Jejum pré-abate em frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.3, p.199-209, 2001. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2001000300001>

MORI, T.; OKAMURA, N.; KISHINO, K.; WADA, S.; ZOU, B.; NANBA, T.; ITO, T.. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* serotypes Isolated from Poultry Meat in Japan. **Food Safety**, v. 6, n. 3, p. 126 – 129, 2017. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2017019>

OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; MICHAEL, G.B.; CARDOSO, M.I.R.; CANAL, C.W.; BRANDELLI A. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian Journal Microbiology**, v.34, n. 1, p. 123 – 124, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000500042>

PESSIER, A. P. An overview of amphibian skin disease. **Journal of Exotic Pet Medicine**. v. 11, n. 3, p. 162-174, 2002. <https://doi.org/10.1053/saep.2002.123980>

RAMOS, E.M. **Efeito de diferentes métodos de abate sobre o desenvolvimento do rigor mortis e qualidade da carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802)**. 2004. 191 f. Dissertação (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

RIBAS, A.; POONLAPHDECHA, S. Wild-Caught and Farm-Reared Amphibians are Important Reservoirs of *Salmonella*, A Study in North-East Thailand. **Zoonoses and Public Health**, v. 64, n. 2, p. 106–110, 2016. <https://doi.org/10.1111/zph.12286>

RUI, B.R.; ANGRIMANI, D.S.R.; SILVA, M.A.A. Pontos críticos no manejo pré-abate de frango de corte: jejum, captura, carregamento, transporte e tempo de espera no abatedouro. **Ciência Rural**, v.41, n.7, p.1290-1296, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000092>

SCHETTINO, D.N.; CANÇADO, S.V.; BAIÃO, N.C.; LARA, L.J.C.; FIGUEIREDO, T.C.; SANTOS, W.L.M. Efeito do período de jejum pré-abate sobre o rendimento de carcaça de frango de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.918-924, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000500030>

SERRAINO, A.; BARDASI, L.; RIU, R.; PIZZAMIGLIO, V.; LIUZZO, G.; GALLETI, G.; GIACOMETTI, F.; MERIALDI, G. Visual evaluation of cattle cleanliness and correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. **Meat Science**, v.90, p.502-506, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.08.001>

SHRIVASTAVA, K.P. Quality control of frog legs in India for export. World Conference on Trade in Froglegs, 1. 1986. **Proceedings...** Calcutá, 1986, p.62-73.

SKYBERG, J.A.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. **Avian Diseases**, v.50, p.77-81, 2006. <https://doi.org/10.1637/7417.1>

SWAMY, S.C.; BARNHART, H.M.; LEE, M.D.; DREESEN, D.W. Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonella* isolated from poultry products, wastewater, and human sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3768-3771, 1996. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.10.3768-3771.1996>

TORREJÓN, C.A.B. **Detección de genes de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles en cautiverio, región metropolitana, Chile.** Trabalho de Conclusão de Curso - Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile, 2016.

VAN, T.T.H.; NGUYEN, H.N.K.; SMOOKER, P.M.; COLOE, P.J. The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 98–106, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.032>

ZENG, Y.B.; XIONG, L.G.; TAN, M.F.; LI, H.Q.; YAN, H.; ZHANG, L.; YIN D.F.; KANG, Z.F.; WEI, Q.P.; LUO, L.G. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* in Pork, Chicken, and Duck from Retail Markets of China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16, n. 5, p. 339 – 345, 2019. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2510>

ZHANG, H.; MA, X.; LIU, Y.; DUAN, N.; WU, S.; WANG, Z.; XU, B. Gold nanoparticles enhanced SERS aptasensor for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 872-877, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.033>

WALKE, J.B.; BECKER, M.H.; LOFTUS, S.C.; HOUSE, L.L.; CORMIER, G.; JENSEN, R.V.; BELDEN, L.K.; Amphibian skin may select for rare environmental microbes. **Interdisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v. 8, p. 2207-2217, 2014. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.77>

WALL, A.J. Ethical considerations in the handling and slaughter of farmed fish. In: Kestin, S.C., Warris, P.D. (Eds.). **Farmed Fish Quality**. Fishing News Books, Oxford, pp. 108-115, 2001.

WEBBER,B.; BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; RIZZO, N.N.; TONDO, E.C.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; NASCIMENTO, V.P. Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v.61, n.36, p.1-7, 2019.  
<https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961036>

YANG, X.; WU, Q.; ZHANG, J.; HUANG, J.; CHEN, L.; LIU, S.; YU, S.; CAI, S. Prevalence, enumeration, and characterization of *Salmonella* isolated from aquatic food products from retail markets in China. **Food Control**, v. 57, p. 308-313, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.046>