



Monitoramento de patógenos e indicadores de contaminação em diferentes condições de processamento de produtos cárneos de origem suína no Estado de São Paulo

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

Monitoramento de patógenos e indicadores de contaminação em diferentes condições de processamento de produtos cárneos de origem suína no Estado de São Paulo

GABRIELA TEREZINHA DANIEL

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Orientador(a): Prof (a). Dr (a). Eliana Scarcelli Pinheiro

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Daniel, Gabriela Terezinha.
Monitoramento de patógenos e indicadores de contaminação em diferentes condições de processamento de produtos cárneos de origem suína no Estado de São Paulo./ Gabriela Terezinha Daniel.– São Paulo, 2015.
102 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Qualidade de produtos e processos na produção animal.

Orientador: Eliana Scarcelli Pinheiro.
Versão do título para o inglês: Monitoring of pathogens and indicators of contamination in different conditions of processing of swine meat origin in São Paulo.

1. Linguíça 2. *Salmonella* 3. *Staphylococcus* 4. Coliformes 5. *Campylobacter*

I. Daniel, Gabriela Terezinha II. Pinheiro, Eliana Scarcelli III. Instituto Biológico (São Paulo).
IV. Título

IB/Bibl./2015/007

Orientador(a): Prof Dr Eliana Scarcelli Pinheiro



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Gabriela Terezinha Daniel

Título: Monitoramento de patógenos e indicadores de contaminação em diferentes condições de processamento de produtos cárneos de origem suína no Estado de São Paulo

Orientador(a): **Prof (a) Dr (a) Eliana Scarcelli Pinheiro**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Dedico este trabalho aos meus pais Gilberto e Luzinete

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Gilberto* e *Luzinete*, por mais essa conquista, o sucesso dessa realização não é só minha, essa conquista é nossa, devo todo meu sucesso somente a vocês que me criaram, me educaram, me amaram, me aconselharam e me trouxeram até aqui, vocês são minha estrutura. Pai e mãe, obrigado por realizar esse sonho que é só NOSSO. Amo vocês mais do que tudo no mundo. Obrigado por tudo.

A minha orientadora *Eliana Scarcelli* por aceitar me orientar e tornar esse sonho realidade. Obrigado por toda orientação, ensinamentos, ajuda, preocupação e paciência. Obrigado por todas as conversas e conselhos. Obrigado por todos os elogios que me fizeram sentir competente e feliz. Toda sua atenção e apoio foram essenciais para tornar o desenvolvimento desse projeto algo prazeroso.

A minha “chefinha” *Alessandra Nassar*, mais do que apoio, incentivo, e conselhos, você me deu grandes oportunidades e me trouxe até aqui. Você acreditou e sempre confiou em mim, sou muito grata a você, saiba que tudo isso foi muito importante no meu desenvolvimento durante minha formação profissional. Obrigado pela credibilidade, devo grande parte do meu potencial e sabedoria a você. Obrigado por me aturar durante tanto tempo e mais do que tudo, obrigado por sua amizade.

A *Aline Feola* que me ajudou e ensinou parte da metodologia e a toda equipe e amigas do Laboratório de Bacteriologia Geral, *Simone*, *Renata*, *Rosângela* e *Bernadete* que também colocaram a “mão na massa” durante o desenvolvimento desse projeto e sempre me apoiaram. Obrigado por toda ajuda.

Prof. Dr. *Sergio Santos de Azevedo*, da Universidade Federal de Campina Grande, pela análise estatística.

Aos alunos da pós-graduação do Instituto Biológico (turma de 2013) que foram o grupo de apoio “dos desesperados” durante esses dois anos.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram na minha formação.

DANIEL, G. T. MONITORAMENTO DE PATÓGENOS E INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO DE PRODUTOS CÁRNEOS DE ORIGEM SUÍNA NO ESTADO DE SÃO PAULO. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico

RESUMO

A crescente demanda por derivados suínos tipo frescal representa um aumento do risco destes produtos participarem de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos. Dentre os derivados, a linguiça apresenta um maior risco, pois pode ocorrer contaminação e proliferação dos microrganismos durante o preparo, a manufatura e o estoque do produto, pelo fato de não sofrerem nenhum tratamento térmico no processamento, por suas características intrínsecas e por serem submetidos a intenso manuseio. A análise microbiológica de um alimento visa investigar quantitativamente e qualitativamente a presença de um determinado microrganismo, assim como identificar e caracterizar as diferentes espécies a fim de rastrear as condições de higiene em que o alimento foi processado e os prováveis riscos a saúde do consumidor. Portanto, os objetivos do presente estudo foram avaliar a presença de patógenos como *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes fecais totais e termotolerantes, *Escherichia coli* patogênicas, *Listeria monocytogenes*. e *Campylobacter* spp., em linguiças suínas tipo frescal produzidas artesanalmente e sob fiscalização visando analisar o potencial patogênico desses alimentos como veiculadores de doenças alimentares e as possíveis rotas de contaminação durante o processo de produção, e verificar ainda, se as condições de processamento (artesanal ou industrial) interferem no nível de contaminação dos produtos cárneos. As metodologias utilizadas foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e os resultados avaliados de acordo com as características do alimento, conforme a Resolução RDC nº. 12 de 2001 da ANVISA. Os resultados obtidos das análises das amostras de linguiças artesanais foram: 12% (6/50) das amostras contaminadas com *Salmonella* spp., 58% (29/50) das amostras apresentando níveis acima dos limites aceitáveis na quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva e 76% (38/50) na quantificações de coliformes fecais acima dos limites aceitáveis para consumo. Com relação às linguiças analisadas produzidas sob fiscalização detectou-se 6% (3/50) de amostras contaminadas com *Salmonella* spp. e 24% (12/50) destas apresentaram quantificação de coliformes fecais acima dos limites

aceitáveis, e nenhuma amostra apresentou contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva fora dos padrões. Detectou-se 2% (1/50) de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) em uma das amostras de linguiça fiscalizada. Nenhuma das amostras artesanais e fiscalizadas apresentaram-se contaminadas com *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytogenes*. As águas de produção analisadas não apresentaram contaminação pelos microrganismos pesquisados. Desta forma, há a necessidade de sensibilizar os comerciantes e os consumidores da importância do serviço de inspeção permanente em alimentos derivados de origem animal e que é premente que haja uma produção sanitariamente aceitável, pois as doenças transmitidas por alimentos ainda continuam sendo um problema à saúde pública.

Palavras chave: Linguiça, *Salmonella*, *Staphylococcus*, Coliformes, *Campylobacter* e *Listeria*.

DANIEL, G. T. MONITORING OF PATHOGENS AND INDICATORS OF CONTAMINATION IN DIFFERENT CONDITIONS OF PROCESSING OF SWINE MEAT ORIGIN IN SÃO PAULO STATE. São Paulo. 2015. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico

ABSTRACT

The increasing demand for fresh swine derivatives means a higher risk of their participation in human disease outbreaks transmitted by food. Among the derivatives, the sausage represents a higher risk because there may be contamination and growth of microorganisms during preparation, manufacture and stock, due to the fact that they do not suffer any heat treatment during the procedure, for their intrinsic characteristics and undergoing intense handling. Microbiological analysis of a food product aims to investigate qualitatively and quantitatively the presence of a particular microorganism, as well as identify and characterize the different species in order to trace the hygiene conditions in which it was processed and the likely risks to consumer health. The aims of this study were to evaluate the presence of pathogens such as *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positive, total fecal and thermotolerant coliforms, pathogenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*. and *Campylobacter* spp., in frescal pork sausages either handmade and produced under fiscal supervision in order to analyze the pathogenic potential of these foods of causing foodborne illness and possible routes of contamination during the production process, and verify, if the processing conditions (handmade or industrial) interfere with the level of contamination of meat products. The methods were carried out according to Normative Instruction 62, of 26/08/2003 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento and the results were evaluated according to the characteristics of the food, as described by RDC Resolution No. 12 of 2001 ANVISA. The results regarding handmade sausages were: 12% (6/50) of the samples contaminated with *Salmonella*, 58% (29/50) of the samples showed levels above acceptable limits for the quantification of *Staphylococcus* coagulase-positive and 76% (38/50) above acceptable limits for consumption in the quantification of fecal coliforms. Regarding the analyzed sausages manufactured under fiscal supervision were found to be 6% (3/50) of samples contaminated with *Salmonella* spp. and 24% (12/50) of these had quantification of fecal coliforms above acceptable limits, and none had coagulase positive *Staphylococcus* counts outside the standards. Was detected in 2% (1/50) enteropathogenic *E. coli* (EPEC) in one of the sausages sample manufactured under fiscal supervision. None of the handmade or inspected samples

showed up contaminated with *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes*. The production waters were not contaminated by microorganisms examined. Thus, there is a need to sensitize traders and consumers about the importance of permanent inspection service in foods derived from animal and it is urgent that there is a sanitary acceptable production, because foodborne illnesses are still being a health problem public.

Key words: Sausage, *Salmonella*, *Staphylococcus*, Coliformes, *Campylobacter* and *Listeria*.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Série histórica de surtos de DTA. Brasil, 2000 a 2014 (VE-DTA, 2014)	11
Quadro 2: Sequência nucleotídica dos primers do gene <i>Inv A</i> de <i>Salmonella</i> spp. descritos por Cortez et al. (2006)	34
Quadro 3: Sequência nucleotídica dos primers dos genes <i>fliC</i> e <i>sefA</i> de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Salmonella</i> Typhimurium descritos por Soumet et al. (1999).....	35
Quadro 4: Sequência nucleotídica dos primers dos genes <i>DSR1</i> , <i>DSR2</i> e <i>DSR3</i> de <i>Salmonella</i> Dublin descritos por Akiba et al. (2011).....	35
Quadro 5: Sequência nucleotídica dos primers dos genes <i>fliC-F</i> e <i>fliC-R</i> de <i>Salmonella</i> Choleraesuis descritos por Chiu et al. (2005).	35
Quadro 6: Número mais Provável por grama ou mL, para séries de três tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL e respectivos intervalos de confiança 95%.	39
Quadro 7: Sequência nucleotídica dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> , <i>bfpA</i> , <i>aggR</i> , <i>elt</i> , <i>esth</i> , <i>estp</i> , <i>invE</i> e <i>astA</i> de <i>Escherichia coli</i> descritos Miyuki et al. (2013).....	41
Quadro 8: Principais sorogrupos diarreogênicas de <i>E. coli</i> segundo Miyuki, et al. (2013).....	42
Quadro 9: Sequência nucleotídica dos primers do gene da <i>Listeriolisina</i> para detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> descritos por Blais et al. (1995).....	45
Quadro 10: Sequência nucleotídica dos primers dos genes <i>HIP400F</i> , <i>HIP1134R</i> , <i>CC18F</i> e <i>CC519R</i> de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> descritos por Linton et al. (1997).....	46
Quadro 11: Interpretação para fim de aplicação de plano de amostragem	47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal artesanais contaminadas com *Salmonella* spp. impróprias para consumo. São Paulo, 2015..... 51
- Tabela 2: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal fiscalizadas contaminadas com *Salmonella* spp. impróprias para consumo. São Paulo, 2015..... 51
- Tabela 3: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal artesanais contaminadas com *Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* imprópria para consumo. São Paulo, 2015.. 52
- Tabela 4: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal fiscalizadas contaminadas com *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* imprópria para consumo. São Paulo, 2015.. 52
- Tabela 5: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal artesanais apresentando contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos valores aceitáveis para consumo. São Paulo, 2015..... 53
- Tabela 6: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal fiscalizadas apresentando contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos valores aceitáveis para consumo. São Paulo, 2015. 53
- Tabela 7: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal artesanais apresentando contagem de NMP de coliformes fecais totais e termotolerantes acima dos valores aceitáveis para consumo. São Paulo, 2015.. 54
- Tabela 8: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal fiscalizadas apresentando contagem de NMP de coliformes fecais totais e termotolerantes acima dos valores aceitáveis para consumo. São Paulo, 2015.. 54
- Tabela 9: Resultados das amostras positivas para o isolamento de *E. coli* e detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* e *astA*. São Paulo, 2015..55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Amostras de linguiça suína frescal artesanal coletadas em feiras de rua, açougues e supermercados..... 32
- Figura 2: Ágar MacConkey (Difco®) contendo colônias bacterianas incolores (seta) suspeitas de *Salmonella* spp. 34
- Figura 3: Ágar *Salmonella-Shigella* (Difco®) contendo colônias bacterianas enegrecidas suspeitas de *Salmonella* spp 34
- Figura 4: Contagem de colônias típicas de *Staphylococcus* spp. em meio de cultura ágar Baird Parker (Difco®)..... 37
- Figura 5: Prova da coagulase das colônias de *Staphylococcus* spp. À esquerda resultado negativo e à direita resultado positivo para prova da coagulase (teste Staphyclin da Laborclin®) 37
- Figura 6: Da esquerda para direita, tubos de ensaio contendo 10mL dos meios líquidos LST, VB e EC (Difco®). À esquerda alça tipo “loop” descartável. 40
- Figura 7: Meio de cultura ágar EMB-Levine (Difco®) contendo colônias bacterianas de *Escherichia coli* apresentando coloração verde metálico. 40
- Figura 8: À esquerda filtragem do pellet em membrana de éster de celulose com poro de 0,65 µm e inoculação em meio de Ágar Brucella (Difco®). À direita inoculação da amostra não filtrada em meio de cultura ABS-ATB (Difco®).. 44
- Figura 9: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Salmonella* spp. M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); A: Amostras artesanais; F: Amostras fiscalizadas; C+: Controle positivo *Salmonella* spp.; C-: Controle negativo; pb: pares de bases..... 49
- Figura 10: Resultados obtidos pela amplificação do multiplex PCR para detecção de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); A: Amostras artesanais; F: Amostras fiscalizadas; C+1: Controle positivo de *S. Typhimurium*; C+2: Controle positivo *S. Enteritidis* C-: Controle negativo; pb: pares de bases. 50
- Figura 11: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Salmonella* Choleraesuis. M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); A: Amostras artesanais; F: Amostras fiscalizadas; C+: Controle positivo *S. Choleraesuis*; C-: Controle negativo; pb: pares de bases. 50
- Figura 12: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Salmonella* Dublin. M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); A: Amostras

artesanais; F: Amostras fiscalizadas; C+: Controle positivo *S. Dublin.*; C-: Controle negativo; pb: pares de bases..... 51

Figura 13: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* e *astA* das cepas de *Escherichia coli*. M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); A: Amostras artesanais; F: Amostras fiscalizadas; C+1: STEC; C+2: EPEC atípica; C+3: EIEC; C+4: ETEC; C+5: EAEC; C+6: EPEC; pb: pares de bases..... 56

Figura 14: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* e *astA* das cepas de *Escherichia coli*. M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); A: Amostras artesanais; F: Amostras fiscalizadas; C+1: STEC; C+2: EPEC atípica; C+3: EIEC; C+4: ETEC; C+5: EAEC; C+6: EPEC; pb: pares de bases..... 57

Figura 15: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); A: Amostras artesanais; C+1: Controle positivo de *C. jejuni*; C+2: Controle positivo *C. coli*; C-: Controle negativo; pb: pares de bases. 57

Figura 16: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Listeria monocytogenes*. M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); A: Amostras artesanais; C+: Controle positivo de *Listeria monocytogenes*; C-: Controle negativo; pb: pares de bases. 58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Agentes etiológicos relacionados aos surtos de DTA. Brasil, 2000 a 2014 (VE-DTA, 2014)	11
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

µg - Micrograma (10^{-6} grama)

µL - Microlitro (10^{-6} litro)

µm - Micrômetro (10^{-6} metro)

ABS - Brucella Ágar acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DNTP - Deoxinucleosídeo - trifosfato

DTA - Doença transmitida por alimento

EC - *Escherichia coli*

ECP - *Staphylococcus* coagulase positiva

EDTA - Ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico

g - Grama

LST - Lauril Sulfato Triptose

MC - MacConkey

mg - Miligrama (10^{-3} grama)

mL - Mililitro (10^{-3} litro)

mM - Milimolar (10^{-3} molar)

NMP - Números mais prováveis

°C - Graus centígrados

pb - Pares de bases

PCR - Polymerase Chain Reaction

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol - Picomol (10^{-12} mol)

rpm - Rotação por minuto

SIF - Serviço de inspeção federal

SIM - Serviço inspeção municipal

SISP - Serviço de inspeção estadual

SS - *Salmonella-Shigella*

TSI - Tríplice açúcar ferro

U - Unidade

UFC – Unidade formadora de colônia

VB – Verde Brilhante

Visto terem seu uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Resultados das análises microbiológicas das amostras de linguiça suína frescal artesanal..	95
Anexo 2: Resultados das análises microbiológicas das amostras de linguiça suína frescal fiscalizada.	97
Anexo 3: Resultados do cultivo de <i>Escherichia coli</i> das amostras de linguiça suína frescal artesanal e PCR para detecção dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> , <i>bfpA</i> , <i>aggR</i> , <i>elt</i> , <i>esth</i> , <i>estp</i> , <i>invE</i> e <i>astA</i>	99
Anexo 4: Resultados do cultivo de <i>Escherichia coli</i> das amostras de linguiça suína frescal fiscalizada e PCR para detecção dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> , <i>bfpA</i> , <i>aggR</i> , <i>elt</i> , <i>esth</i> , <i>estp</i> , <i>invE</i> e <i>astA</i>	101

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE QUADROS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Mercado	4
2.2. Embutidos	5
2.3. Segurança alimentar	6
2.4. Abate irregular e produtos embutidos artesanais	8
2.5. Doenças transmitidas por alimentos	10
2.5.1. <i>Salmonella</i> spp	12
2.5.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	18
2.5.3. Coliformes fecais totais, termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	20
2.5.4. Principais subgrupos de <i>E.coli</i> diarréiogênicas	22
2.5.4.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	22
2.5.4.2. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	23
2.5.4.3. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	23
2.5.4.4. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	25
2.5.4.5. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC)	26
2.5.5. <i>Campylobacter</i> spp	27
2.5.6. <i>Listeria</i> spp.	29
2.6. Qualidade da água na indústria de alimentos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Obtenção das amostras	32
3.2. Metodologia para cultivo de <i>Salmonella</i> spp.	33
3.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para identificação das <i>Salmonella</i> spp., <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Dublin</i> e <i>S. Choleraesuis</i>	34
3.4. Metodologia para contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	36

3.5. Metodologia para contagem dos números mais prováveis de coliformes totais e termotolerantes.....	38
3.5.1. Prova presuntiva.....	38
3.5.2. Prova confirmatória.....	38
3.6. Metodologia para cultivo de <i>Escherichia coli</i>	40
3.7. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção dos diferentes genes de <i>Escherichia coli</i>	41
3.8. Metodologia para cultivo e identificação de <i>Campylobacter</i> spp.	43
3.9. Extração de DNA para pesquisa de <i>Campylobacter coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	44
3.10. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	45
3.11. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificação de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i>	46
3.12. Interpretação dos resultados.....	47
3.13. Análise estatística.....	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Cultivo de <i>Salmonella</i> spp. e detecção de <i>Salmonella</i> spp., <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Choleraesuis</i> e <i>S. Dublin</i> pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	49
4.2. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva UFC/g.	52
4.3. Contagem dos NMP de coliformes fecais totais e termotolerante	53
4.4. Detecção dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> , <i>bfpA</i> , <i>aggR</i> , <i>elt</i> , <i>esth</i> , <i>estp</i> , <i>invE</i> , <i>astA</i> nos isolados de <i>Escherichia coli</i> pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	54
4.5. Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. pela técnica de cultivo e <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase PCR	57
4.6. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase PCR	58
4.7. Análise microbiológica das águas de processamento das linguiças produzidas sob fiscalização	58
4.8. Análise estatística.....	59
4.8.1. <i>Salmonella</i> spp	59
4.8.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	59
4.8.3. Coliformes fecais	59
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ANEXOS 95

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda de derivados suínos tipo frescal representa um aumento do risco destes produtos participarem de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos. Dentre os derivados, a linguiça apresenta um maior risco, pois pode ocorrer contaminação e proliferação dos microrganismos durante o preparo, a manufatura e o estoque do produto, pelo fato de não sofrerem nenhum tratamento térmico no processamento, por suas características intrínsecas e por serem submetidos a intenso manuseio (CASTAGNA et al., 2004).

Outro problema é a produção e comercialização de produtos cárneos artesanais, pois geralmente as condições higiênico-sanitárias no abate de animais, produção e comercialização são precárias, verificando-se a presença de microrganismos patogênicos, principalmente *Salmonella* spp., constituindo-se um sério risco a saúde do consumidor (SILVA, 1999).

Condições sanitárias deficientes durante o abate dos animais, cozimento inadequado, armazenamento impróprio, e falta de higiene durante o preparo dos produtos cárneos, são condições que podem predispor os indivíduos a tornarem-se portadores assintomáticos ou doentes (PELCZAR, 1997).

A transmissão de *Salmonella* ao homem ocorre geralmente pela ingestão de produtos de origem animal contaminados (WEGENER; BAGER, 1997). A presença de *Salmonella* em suínos pode representar um risco à saúde pública, uma vez que tem se observado o aumento do número de surtos, devido ao consumo de produtos suínos contaminados.

A *Salmonella* é um dos principais agentes de infecções alimentares em diversos países (LACONHA et al., 2000; LOPALCO et al., 2000). Ao longo dos anos, as aves e seus subprodutos ocuparam maior importância como fonte de infecção por *Salmonella* entérica em humanos (BAGGESEN; WEGENER, 1994; OLIVEIRA et al., 1992). Porém, nos últimos anos, os suínos e seus derivados também vêm se tornando fonte dessa infecção, crescendo com destaque nos casos de salmonelose transmitida por produtos de origem animal, e é um dos microrganismos mais envolvidos em casos e surtos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive o Brasil. A pesquisa da presença ou ausência de *Salmonella* spp., tem sido utilizada para avaliar as condições higiênico-sanitárias dos alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2006).

Outro microrganismo observado comumente nesse tipo de alimento é o *Staphylococcus aureus*, citado como um dos principais agentes de DTA, responsável por intoxicação alimentar no homem, que por sua vez é causada pela ingestão de

alimentos contaminados com toxinas pré-sintetizadas pelas bactérias, neste caso denominadas enterotoxinas estafilocócicas (NORMANO et al., 2005).

Em função do risco à saúde pública que a presença de *S. aureus* em alimentos representa, estabeleceu-se a obrigatoriedade de sua pesquisa e enumeração em diversos países, como parte da fiscalização sanitária de órgãos governamentais (SILVA et al., 2004).

Os coliformes fecais indicam contaminação de origem fecal recente do produto (MOTTA et al., 2000), sendo que a detecção de elevado número destas bactérias em um alimento, inclusive nos processados, é interpretada como possível presença de patógenos intestinais (PARDI et al., 1993). Os coliformes são microrganismos indicadores de condições sanitárias indesejáveis, principalmente em processamento de alimentos. A contagem de coliformes termotolerantes, também tem sido utilizada para avaliar as condições higiênico-sanitárias dos alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2006).

Outra zoonose de grande importância é a campilobacteriose, que tem distribuição mundial, onde seus principais representantes são as espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. Considerados microrganismos ubiqüitários, são encontrados tanto dispersos no ambiente, como também assumindo o papel de agentes patogênicos ou comensais do trato gastrointestinal de animais domésticos e selvagens (ALTEKRUSE, 1998; SCARCELLI et al., 2005).

As enterites por *Campylobacter* estão bem caracterizadas como doenças zoonóticas de origem alimentar, onde vários estudos têm demonstrado a significância dos reservatórios animais na epidemiologia do *Campylobacter* spp. e os alimentos de origem animal considerados a principal fonte de infecção (ALTEKRUSE et al., 1999; CARVALHO et al., 2010).

Listeria spp. encontra-se amplamente distribuída na natureza, fato que explica a facilidade com que é encontrada em alimentos, desde a produção até o consumo (BEUCHAT, 1996). A pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo é de grande importância, pois se sabe que os alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose são aqueles processados industrialmente, mantidos sob refrigeração, com vida de prateleira longa, e que oferecem condições adequadas para a sua multiplicação. Diversas formas de transmissão do microrganismo a humanos já foram relatadas, mas a via alimentar parece ser a mais preocupante (CDC, 2013).

As doenças transmitidas por alimentos continuam sendo um problema à saúde pública, apesar da melhoria de controles sanitários nos últimos anos. A cadeia alimentar é muito extensa e, deve-se controlar e monitorar os riscos das atividades

relacionados a todas as etapas de produção, desde a matéria prima até o produto final, garantindo higiene e segurança dos alimentos. Os procedimentos de controle devem ser frequentemente verificados de forma a proceder às correções necessárias. Ainda são escassos os dados referentes à epidemiologia microbiana do principal derivado da carne suína (linguiças) produzidas artesanalmente e em frigoríficos localizados no Estado de São Paulo, visando à detecção dos principais agentes etiológicos bacterianos mais comuns nesses produtos, e sua forma de disseminação na linha de produção, justificando a importância do presente estudo.

1.1. Objetivos

Gerais:

Avaliar a presença de patógenos em linguiças suínas tipo frescal produzidas artesanalmente e sob fiscalização visando analisar o potencial patogênico desses alimentos como veiculadores de doenças alimentares e as possíveis rotas de contaminação durante o processo de produção, e verificar se as condições de processamento interferem no nível de contaminação destes produtos.

Específicos:

- Detectar estirpes de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. nas amostras de linguiças de origem suína por meio das técnicas de isolamento e identificação microbiológica.
- Empregar a reação em cadeia pela polimerase (PCR), para identificação dos sorotipos de *Salmonella* entérica: Enteritidis, Typhimurium, Choleraesuis e Dublin utilizando as colônias isoladas no cultivo microbiológico.
- Empregar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes*.
- Realizar a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (ECP).
- Realizar a determinação dos números mais prováveis de coliformes fecais totais e termotolerantes por grama (NMP/g).

- Realizar o isolamento de *Escherichia coli* das amostras positivas no teste de determinação de coliformes fecais termotolerantes.
- Empregar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) das colônias isoladas de *Escherichia coli* para pesquisa dos genes relacionados aos fatores de virulência *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE*, *astA* e suas classificações em STEC, EPEC, EPEC atípica, ETEC, EIEC e EAggEC.
- Avaliação microbiológica da água utilizada nas operações de produção dos embutidos industrializados produzidos sob Fiscalização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mercado

Segundo a ABIPECS (Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína), o consumo mundial de carne suína foi equivalente a 107.242 toneladas no ano de 2013, sendo os principais países consumidores China, União Européia, Estados Unidos, Rússia e o Brasil ocupando o 5º lugar tendo o consumo total de 2.771 toneladas no ano de 2013 (ABIPECS, 2013a).

Em 2013, o Brasil importou o equivalente a 6.810 toneladas (ABIPECS, 2013b) e exportou 7.058 toneladas de carne suína (ABIPECS, 2013c). Estima-se que a produção de carne suína atinja média anual de 2,84%, no período de 2008/2009 a 2018/2019, e o seu consumo aumente 1,79%. Em relação às exportações, a representatividade do mercado brasileiro de carne suína saltará de 10,1%, em 2008, para 21% em 2018/2019 (BRASIL, 2013a).

Tanto a carne “in natura”, quanto os produtos processados têm sua aquisição domiciliar per capita elevada à medida que cresce a renda do consumidor. Aqueles com maior valor agregado como o presunto ou os cortes de carne “in natura” apresentam elevação da aquisição per capita à medida que cresce a renda (o mesmo ocorre com a carne bovina de primeira). Por outro lado, entre produtos processados como linguiça e mortadela, a aquisição per capita não sofre tanta influência da renda ou até mesmo se reduz a partir de faixas de renda intermediárias (o mesmo ocorre com a carne bovina de segunda e de aves). Desta forma, à medida que a renda se eleva, ocorre uma substituição dos produtos processados pela carne “in natura”

(exceto para a última faixa de renda). Este padrão se verifica em todas as regiões, sendo que no Sudeste ele é menos acentuado (MIELE, 2011).

2.2. Embutidos

O decreto de lei nº. 52.504 define embutidos como sendo produtos elaborados com carnes ou outros tecidos animais comestíveis, curados ou não, condimentados, cozidos ou não, defumados e dessecados ou não, tendo como envoltório natural tripas, bexigas ou outras membranas animais ou envoltório plástico apropriado (SÃO PAULO, 1970).

O produto embutido será designado pelo seu nome, seguido da classe a que corresponde, ou tipo, ou espécie animal de que provem, podendo ser seguido ainda de complementações elucidativas quanto às características peculiares como "linguiça defumada", "salsicha tipo Viena" e etc. Os mesmos serão classificados quanto ao processo de fabricação (frescos, cozidos, defumados, secos), de acordo com a composição (simples ou mistos) e por fim, segundo ao seu tipo característico, definidos em chouriço que é o produto preparado com mistura de carnes bovina e suína, trituradas ou picadas, fortemente condimentadas, com certa porção de sangue, embutido em tripas do bovino cozido e defumado, e a linguiça cujo produto é preparado com mistura de carne picada, toucinho e condimentos, embutidos em tripas finas de suíno, ovino caprino ou vitela, defumado, ou não, conservado pela salga. As linguiças poderão ser de carne suína, bovina ou mistura das duas (SÃO PAULO, 1970).

De acordo com o processo de preparação a linguiça poderá ser definida como linguiça frescal (é a linguiça que corresponde à definição) e linguiça dessecada (é a linguiça parcialmente desidratada por processo tecnológico adequado). A linguiça segundo o estilo de preparação e condimentação poderá classificar-se ainda em tipos como "tipo calabresa", "tipo napolitana", "tipo portuguesa", etc (SÃO PAULO, 1970).

Com relação às características gerais os embutidos devem ser preparados de carne e outros tecidos animais em perfeito estado de conservação, segundo o tipo de embutido e suas peculiaridades, podem entrar na sua composição, tendões e cartilagens. O sangue utilizado deverá ser colhido isoladamente de cada animal em recipiente separado, sendo rejeitado o sangue procedente de animal considerado impróprio para o consumo pela inspeção sanitária. Não é permitido o uso de sangue com a fibrina, e a desfibrinização não poderá ser feita à mão. Não será permitido o

emprego de matérias primas de qualidade ou em proporção diferentes das constantes da fórmula aprovada. Em nenhum tipo será permitido o emprego de gordura de bovino em substituição ao toucinho. Nos embutidos não é permitido ser adicionados tecidos inferiores e não devem apresentar a superfície úmida, pegajosa, exsudando líquido, ou partes flácidas ou de consistência anormal com indícios de fermentação pútrida. Devem ser manipulados em boas condições de higiene, devendo estar isentos de parasitas, bolores, sujidades e microrganismos que indiquem manipulação defeituosa do produto. As tripas e membranas de animais empregados como envoltório devem estar rigorosamente limpas e sofrer lavagem imediatamente antes de seu uso. É permitido dar um banho de parafina pura na membrana que envolve os embutidos. Também é permitido, com a mesma finalidade, o emprego de resmas e polímetros desde que não prejudiquem o produto. Os envoltórios não devem estar perfurados por parasitos. Os embutidos podem ser enlatados, desde que as latas sofram o mesmo tratamento das conservas enlatadas em geral, devendo obedecer à norma para carnes preparadas enlatadas (SÃO PAULO, 1970).

2.3. Segurança Alimentar

A análise microbiológica de um alimento visa investigar quantitativamente e qualitativamente a presença de um determinado microrganismo em um produto, assim como identificar e caracterizar as diferentes espécies a fim de rastrear as condições de higiene em que o alimento foi processado e os prováveis riscos a saúde do consumidor. Apesar da utilização de diferentes técnicas para garantir a qualidade e a inocuidade de alimentos, as doenças transmitidas por alimentos (DTA) continuam sendo um problema de saúde pública. Cerca de 75% das novas doenças que têm afetado os seres humanos ao longo dos últimos 10 anos, foram causadas por patógenos provenientes de um animal ou produtos de origem animal e todos os anos, milhões de pessoas adoecem em razão das zoonoses de origem alimentar (GERMANO, 1993; OMS, 2009)

Dentre os alimentos envolvidos com maior frequência como veiculadores de enfermidades ao homem encontram-se as carnes bovina e de frango (GERMANO et al., 1993), bem como a carne suína e seus derivados, principalmente as linguiças (MANCHA et al., 1999). Ressalta-se que a linguiça frescal é um alimento exposto à contaminação e representa um excelente meio para desenvolvimento e multiplicação de microrganismos (AMARAL et al., 1984; PANETTA et al., 1984). As prováveis fontes

de contaminação para esses produtos compreendem as carnes, os envoltórios, os temperos ou condimentos, bem como a água utilizada em todas as operações de limpeza e manutenção, manipulação e nas máquinas e utensílios (OLIVEIRA et al., 1992).

No Brasil, existem normatizações adequadas para controle sanitário dos alimentos, como o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Com relação ao controle de alimentos no Brasil, o marco legal que possibilitou uma maior agilidade a toda estrutura de Vigilância Sanitária se deu com a criação da ANVISA em 1999. Com isto o controle dos alimentos no Brasil passou a ser mais eficiente. Com a mudança na lei permitindo a ANVISA o acesso e a anuência das licenças de importação de produtos sujeitos a vigilância sanitária, tornou-se possível o controle dos produtos importados. Com a atualização da legislação, segundo referências internacionais, colocou o país no mesmo nível de discussão técnica com restante do mundo, possibilitando discutir questões sanitárias e segurança alimentar com outros países e blocos econômicos. Esta regulamentação se faz com a publicação de Regulamentos Técnicos, que podem ser regulamentos horizontais ou verticais, ou seja, trata de assuntos gerais para todos os alimentos (Rotulagem, Embalagem, Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia, Contaminantes, Padrões Microscópicos e Microbiológicos, etc.) ou específicos por alimento ou categoria de alimento (Padrão de Identidade e Qualidade de Produtos). Outras formas de controle dos alimentos são realizadas através de uma política de inspeção e de programas de monitoramento de produtos no comércio com a participação das vigilâncias estaduais e dos Laboratórios de Centrais de Saúde Pública – LACEN, bem como, através de medidas sanitárias, onde o critério utilizado leva em conta o risco à saúde do consumidor. Estas últimas são ações de vigilância sanitária de abrangência nacional, imediatas, voltadas para coibir ou prevenir riscos advindos de produtos ou práticas que possam trazer prejuízos à saúde da população. (ANVISA, 2002)

Além disto, uma importante missão da ANVISA é a educação. Para tanto, a Diretoria de Alimentos e toxicologia firmou convênio com SENAI e SEBRAE para capacitação do Setor Produtivo em Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC ou HACCP) e assinou um Projeto de Cooperação Técnica com o INPPAZ/OMS para capacitação de técnicos do Governo nos mesmos assuntos direcionados a Inspeção e Fiscalização (ANVISA, 2002)

Com o objetivo de proteger a saúde dos consumidores e, ao mesmo tempo, zelar pela aplicação de práticas leais no comércio de alimentos, surgiram vários acordos comerciais multilaterais. Dentre estes, temos o “Acordo sobre a Aplicação de

Medidas Sanitárias e Fitossanitárias” (SPS) e o “Acordo sobre Obstáculos Técnicos ao Comércio” (TBT), bem como, programas ligados a FAO e a OMS, como por exemplo, o *Codex Alimentarius*. Este último trata-se de um Código Alimentário Internacional compostos de normas básicas sobre alimentos. (ANVISA, 2002)

Quando se trata de segurança na cadeia alimentar objetiva-se o controle de qualidade em todas as etapas de produção de um alimento, ou seja, controle de todas as atividades relacionadas à produção, beneficiamento, armazenamento, transporte, industrialização, embalagem, reembalagem, comercialização, utilização e consumo de alimentos, considerando-se suas interações com o meio ambiente, o homem e seu contexto sócio econômico (ANVISA, 2002).

Há dois grupos distintos de empresas e cooperativas que abatem animais, processam e distribuem carne animal no Brasil, o subsistema sob Inspeção Federal (SIF) e o subsistema sob inspeção Estadual (SIE) e Municipal (SIM). O sistema de inspeção sanitária constitui importante fator de credibilidade para o segmento de abate e processamento de carne, na medida em que certifica o produto para os mercados interno e externo. O abate formal de animais é regido por legislação sanitária específica e possui três níveis de inspeção e fiscalização: Federal, exercida pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), Estadual, por intermédio do Serviço de Inspeção Estadual (SIE), e Municipal, por meio do Serviço de Inspeção Municipal (SIM). Essa divisão de trabalho encontra-se estabelecida em lei. Os estabelecimentos sob controle Federal podem realizar o comércio nacional e internacional de sua produção, os da esfera Estadual têm sua atuação restrita ao âmbito do Estado, e os da esfera Municipal estão circunscritos às respectivas divisas municipais (INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2002).

2.4. Abate irregular e produção de embutidos artesanais

A informalidade e a fiscalização ineficiente, ou de caráter apenas punitivo, constitui fator restritivo à eficiência e competitividade da cadeia, afetando negativamente os sistemas tributário, regulatório e de inspeção. Para ser bem sucedido, o esforço de eliminação da informalidade deverá ser realizado em frentes distintas, envolvendo tanto a conscientização do consumidor, quanto o fortalecimento e aparelhamento dos órgãos de inspeção e fiscalização tributária e sanitária. Assim, é necessária a intensificação das ações dos órgãos estaduais e municipais de fiscalização tributária e de inspeção e vigilância sanitária, no sentido de prevenir e

coibir o abate comercial, o transporte e a comercialização de carne suína e produtos derivados, produzidos de forma irregular/informal. Os possíveis agentes executores dessas ações são as Secretarias estaduais e municipais da Agricultura, Fazenda e Saúde; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; e entidades privadas, governamentais e não-governamentais (INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2002).

A implantação do selo de certificação de qualidade também pode ser uma solução contra as práticas irregulares de abate, pois o desenvolvimento da atividade de abate e/ou processamento com inspeção estadual ou municipal, no Estado, sofre a concorrência de produtos com inspeção federal, que têm, na percepção da distribuição e do consumidor final, uma imagem de qualidade superior. Por essa razão, o desenvolvimento de um sistema de certificação de qualidade – e ainda como diferencial uma certificação social – objetiva a valorização e o fortalecimento das empresas de atuação regional, geralmente sob gestão familiar, como produtoras de produtos de qualidade. Para tanto, deve-se desenvolver e implantar um selo que certifique os produtos derivados do abate e processamento de carne bovina, suína e aves. Este selo constitui a garantia de origem, cuidados da manipulação e processamento e qualidade do produto final para consumo. Deverá ser conferido por certificadora credenciada pela Agência Reguladora, para produtos com inspeção estadual ou municipal. Nesse caso os agentes executores seriam a Agência Reguladora, governos Estaduais e Municipais e associações de classe (INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2002).

Em São Paulo, no Município de Socorro, está sendo instituída uma lei sobre a comercialização de produtos embutidos artesanais derivados de carnes. A lei nº. 3768/2013 dispõe que a elaboração destes produtos embutidos, sob a forma artesanal, deverá ser utilizada matéria prima que satisfaça a legislação de defesa sanitária animal. Os animais destinados à elaboração de produtos embutidos derivados de carnes deverão ser abatidos em estabelecimentos sob inspeção higiênico-sanitária oficial (SIF, SISP ou SIM). Para sua comprovação, o estabelecimento processador deverá apresentar, quando da fiscalização por este Serviço de Inspeção Municipal, as notas fiscais que comprovem terem sido estas carnes adquiridas nestes estabelecimentos. Compete ao Serviço de Inspeção Municipal de Produtos de Origem Animal do Departamento de Agricultura e Abastecimento do Município de Socorro, Estado de São Paulo, a fiscalização higiênico-sanitária e tecnológica dos produtos artesanais, a prestação de orientação técnica aos interessados em processarem produtos embutidos de que trata esta Lei. O produtor artesanal deverá apresentar relatório mensal com os dados de produção

bem como manter livro para registro de informações, recomendações e visitas de fiscalização, efetuadas para controle higiênico-sanitário e tecnológico do produto e deverão ter registro de sua composição e método de processamento junto ao Serviço de Inspeção Municipal de Produtos de Origem Animal, observadas as normas técnicas (PREFEITURA MUNICIPAL DA ESTÂNCIA DE SOCORRO, 2013)

2.5. Doenças transmitidas por alimentos

As enfermidades de origem alimentar ocorrem quando uma pessoa contrai uma doença devido à ingestão de um produto contaminado com microrganismos e/ ou toxinas indesejáveis. Essa condição é frequentemente denominada como toxinfecção alimentar (FORSYTHE, 2002).

A OMS estima que, anualmente, mais de um terço da população mundial adoecem devido a surtos de DTA, mas somente uma pequena proporção é notificada (SINAN, 2014).

As populações de baixa renda geralmente são as mais afetadas pela contaminação alimentar, devido aos hábitos culturais da alimentação e à necessidade de optar por produtos com menor preço, geralmente de pior qualidade e mais contaminados (BALBANI e BUTUGAN, 2001). De fato, as regiões Norte e Nordeste do país são as que apresentam as maiores taxas de incidência de casos de DTA, comparadas com as outras regiões (CARMO et al., 2005).

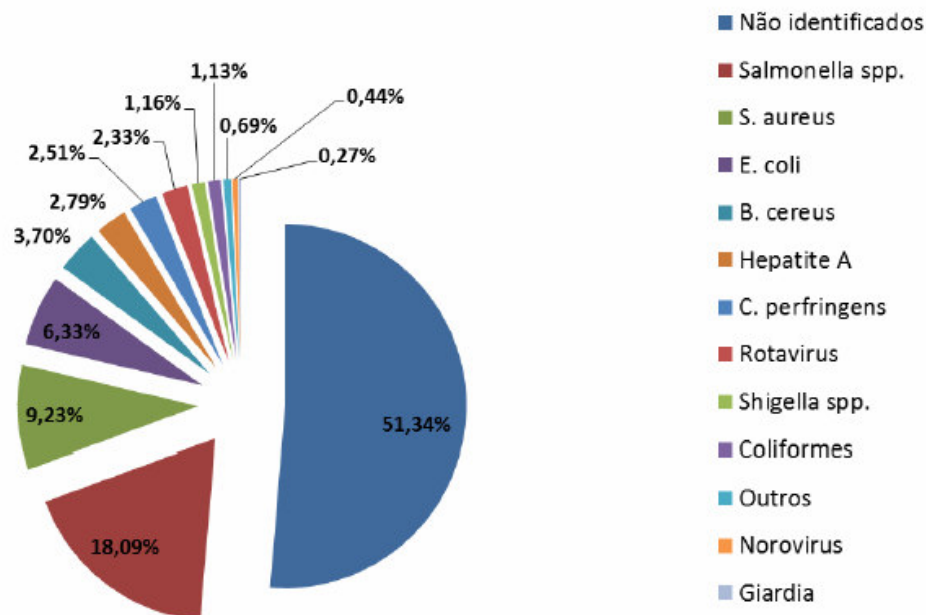
Segundo dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, ocorreram mais de 3.400.000 internações por DTA no Brasil, de 1999 a 2004, com uma média de cerca de 570 mil casos por ano (CARMO et al., 2005).

De acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), de 1999 a 2002, ocorreram 25.281 óbitos por DTA no Brasil, com uma média de 6.320 óbitos por ano (CARMO et al., 2005).

Dados recentes mostram uma série histórica de surtos de DTA no Brasil (Quadro 1) e os principais agentes envolvidos (Gráfico 1).

Quadro 1: Série histórica de surtos de DTA. Brasil, 2000 a 2014 (VE-DTA, 2014).

Ano	Surto	Doentes	Expostos
2000	427	9.535	31.821
2001	872	15.631	211.228
2002	806	12.391	116.962
2003	619	17.910	688.772
2004	635	21.776	368.109
2005	913	17.214	242.191
2006	573	10.312	49.465
2007	683	11.708	25.195
2008	641	8.995	23.275
2009	594	9.431	24.014
2010	498	8.626	23.954
2011	795	17.884	52.662
2012	863	14.670	42.138
2013	800	16.720	42.072
2014*	209	2.950	6.286
Total	9.719	192.803	1.948.144

Gráfico 1: Agentes etiológicos relacionados aos surtos de DTA. Brasil, 2000 a 2014 (VE-DTA, 2014).

O impacto econômico negativo causado pelas DTA alcança níveis cada vez mais preocupantes, acarretando grandes perdas para a indústria, o turismo e a sociedade (NASCIMENTO, 2000). No Brasil, os custos com os casos de internação

por DTA, de 1999 a 2004, foram de 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano (CARMO et al., 2005). A maioria dos casos de DTA, porém, não é notificada, pois muitos microrganismos patogênicos presentes nos alimentos causam sintomas brandos, fazendo com que a vítima não busque auxílio médico (COSTALUNGA & TONDO, 2002; FORSYTHE, 2002).

Entre as causas mais frequentes de contaminação dos alimentos, destacam-se a manipulação e a conservação inadequadas dos mesmos, além da contaminação cruzada entre produtos crus e processados (COSTALUNGA & TONDO, 2002; SANTOS et al., 2002; NADVORNY et al., 2004; CARMO et al., 2005).

Segundo o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), surto de DTA é o episódio em que duas ou mais pessoas apresentam doença semelhante após ingerirem alimentos de origem comum. A identificação e investigação de surtos causados por alimentos é um componente essencial na prevenção e no controle das DTA. Surtos sem esclarecimento etiológico geralmente têm como causas a notificação tardia, a ausência de coleta de amostras clínicas e/ou de alimentos em tempo oportuno, ou testes laboratoriais inadequados (EDUARDO et al., 2003). Embora seja possível, mesmo sem o isolamento do agente etiológico responsável pelo surto, levantar hipóteses quanto à etiologia do mesmo e determinar medidas de prevenção (BARRETO & COSTA 1998).

2.5.1. *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* spp. é composto por bacilos Gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae (HOLT, et al. 1994). São anaeróbios facultativos, móveis por flagelos peritríqueos, com exceção dos sorotipos Gallinarum e Pullorum (WILCOK e SCHWARTZ, 1993). Geralmente não fermentam a lactose (CLARKE & GYLES, 1993).

São organismos quimiotróficos, apresentando metabolismo tanto respiratório como fermentativo (HOLT, et al., 1994). A partir de fermentação de D-glicose e outros carboidratos produzem ácido e gás (JAY, 1992; TORTORA et. al., 1993). São indol negativos, oxidase negativos, catalase positivos e produzem gás sulfídrico (HOLT et al., 1994). A temperatura ótima para crescimento é 37°C (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Atualmente, existem aproximadamente 2500 sorovares identificados de *Salmonella* spp., com vasta distribuição na natureza (SCHWARTZ, 2000), sendo mais de 2000 sorovares isolados de vertebrados (SCHWARTZ, 1991).

Há sorovares de *Salmonella* spp. que são adaptados a um hospedeiro específico (Typhi para humanos, Choleraesuis para suínos e o Dublin para bovinos) (SCHWARTZ, 2000), enquanto outros sorovares (Typhimurium, Anatum, Newport, entre outros) afetam um grande número de hospedeiros, desenvolvendo importante papel na disseminação da infecção entre diferentes espécies (HIRSH, 1990). Diferentes sorovares podem infectar o suíno, mas poucos constituem causa significativa de doenças, como a Choleraesuis e Typhimurium (SOBESTIANSKY, et al., 1999).

A infecção por *Salmonella* pode ser considerada sob dois aspectos: presença de sorotipos patogênicos, adaptados ao suíno, que provocam gastroenterites e septicemias e a presença de sorotipos que não causam doença nos animais, mas são as principais fontes de contaminação das carcaças nos frigoríficos e que podem infectar humanos (ALBAN & STARK, 2005).

Baseado em estudos genômicos, o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (GRIMONT & WEILL, 2007). *Salmonella enterica* possui seis subespécies expressas por nomes e algarismos romanos, as quais apresentam diferenças bioquímicas e genômicas entre si: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II); *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécie *houtanae* (IV), e *S. enterica* subespécie *indica*(VI), enquanto que *S. bongori* apresenta apenas a subespécie *bongori* (V) (GUIBOURDENCHE et al., 2010). A classificação do gênero *Salmonella* está baseada atualmente no esquema de White-Kaufmann-Le Minor e envolve mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* identificados. Está relacionada à caracterização de seus antígenos somáticos (O) de parede natureza lipopolissacarídea, os flagelares (H) de natureza proteica e os capsulares ligados à virulência (Vi). Os antígenos O são resistentes ao calor e ao álcool, os antígenos Vi resistentes ao calor e os antígenos H são formados por uma proteína denominada flagelina, que é termolábil, inativada lentamente pelo álcool e que pode existir tanto na forma simples (monomérica) ou em duas formas separadas (difásica) (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

As subespécies de *Salmonella* são divididas em sorogrupos, cuja classificação é feita a partir do antígeno O. Dentro dos sorogrupos existem os sorotipos específicos. Ainda, cada subespécie possui vários sorotipos e suas respectivas linhagens, onde

aproximadamente 99% dos sorotipos mais comumente isolados pertencem à subespécie *enterica* (GRIMONT & WEILL, 2007).

Os diversos sorotipos e linhagens existentes de *Salmonella* podem causar doenças sistêmicas restritas a determinadas espécies, tais como: *Salmonella enterica* sorotipo Typhi em seres humanos; *Salmonella entérica* sorotipo Choleraesuis em suínos; *Salmonella enterica* sorotipo Dublin em bovinos; *Salmonella enterica* sorotipo Pullorum e *Salmonella enterica* sorotipo Gallinarum em aves. Já outros sorotipos como Typhimurium e Enteritidis podem determinar doença gastrointestinal em amplo espectro de hospedeiros (VOLF et al., 2012).

Vários destes sorotipos podem também, após o aparecimento e posterior resolução da doença clínica no animal, persistir nos tecidos deste durante longos períodos, ou ainda, podem infectar o animal sem manifestação clínica caracterizando focos de contaminação assintomáticos em animais de produção (BERCHIERI JUNIOR. et al., 2010). Em geral, a infecção por *Salmonella* sp. determina manifestações subclínicas em suínos, sendo poucos sorotipos, como o Choleraesuis e o Typhimurium, os que constituem causa significativa de doença (KICH & CARDOSO, 2012).

A bactéria *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis foi a primeira isolada em suínos no final do século 19, apenas dois anos após o descobrimento do gênero *Salmonella* por Daniel E. Salmon (QUINN et al., 2007). O sorotipo Choleraesuis é altamente adaptado ao organismo de suínos podendo permanecer em dormência no rebanho até que haja um ou vários fatores estressantes aos animais que propiciam a proliferação da bactéria e o desenvolvimento da doença nos animais (CHIU et al., 2004).

Pertence ao grupo O:7 (C1) na classificação de acordo com antígenos somáticos, flagelares e capsulares (GRIMONT & WEILL, 2007). A principal fonte de contaminação é o próprio suíno infectado e suas fezes contaminadas, podendo haver presença da bactéria em instalações e ração fornecida aos animais. O estado de portador de suínos infectados já foi observado experimentalmente, em contraste, em condições naturais, os suínos permanecem portadores inaparentes por dois a três meses após a infecção e a recuperação da enfermidade clínica (JACKSON & COCKCROFT, 2007). É isolado frequentemente em suídeos e raramente de outras espécies de animais (QUINN et al., 2007).

A alta viabilidade da bactéria em ambientes e alimentos é um agravante na infecção de animais e de humanos, podendo haver a recontaminação periódica na granja. Em consequência disso, animais recentemente introduzidos no sistema de produção rapidamente se contaminam, e constituem grande risco aos seres humanos

que tem contato com instalações, produtos e animais contaminados (MULLER et al., 2009; SILVA et. al, 2009).

Este sorotipo é caracterizado como sendo de alta prevalência em relação a outros que vêm sendo isolados nos alimentos e incriminados em surtos de doenças em humanos (JACKSON & COCKCROFT, 2007). Nas últimas décadas, o sorotipo *Choleraesuis* não tem representado grande porcentagem dentre os sorotipos isolados de suínos, apresentando raros picos em alguns anos, mas de pouca representatividade de maneira geral (FOLEY et al., 2008). No Brasil, os trabalhos mais recentes que analisaram de suínos em granjas, frigoríficos e produtos originados de carne suína não isolaram o sorotipo em questão, havendo maior incidência de outros sorotipos não específicos aos suínos (MICHAEL et al., 2002; BESSA, 2006; SPRICIGO et. al, 2008; MULLER et al., 2009; SILVA et. al, 2009).

A apresentação clínica da doença e a gravidade dos sinais clínicos dependem das condições de resistência dos animais, incluindo infecções concomitantes, e da cepa envolvida. Algumas cepas de *Salmonella Choleraesuis* podem levar a óbito quase que 100% de animais jovens, enquanto cepas menos invasivas causam apenas diarreia ou nenhum sinal clínico. A debilitação do animal, por doença intercorrente ou por situações estressantes, aumenta o risco de surtos e gravidade da salmonelose (KICH & CARDOSO, 2012). Estudos realizados por FEDORKA-CRAY et al. (1994) determinaram também a importância da dose de células de *Salmonella Choleraesuis* no estabelecimento da infecção nos suínos observando a presença de doença clínica severa em doses infectivas de 10^9 UFC/g ou mais e que doses iguais a 10^6 UFC/g seriam suficientes para causar letargia e depressão nos animais.

Salmonella Choleraesuis é um importante sorotipo para a saúde humana visto que possui alta infectividade em humanos, nos quais pode causar enterite grave e septicemia. Esporadicamente, a bactéria pode causar uma síndrome específica no qual há uma predileção à instalação de bactérias na artéria aorta abdominal, podendo resultar em sintomas como hipertensão, aneurisma e septicemia, de etiologia pouco esclarecida (FORBES & HANDLING, 2006).

O sorotipo *Salmonella Typhimurium* é o mais isolado em suínos (JACKSON & COCKCROFT, 2007), sendo também um dos mais estudados pela sua capacidade de infectar amplo espectro de animais e por causa de suas linhagens multirresistentes a desinfetantes e antimicrobianos comuns (HOTOON et al., 2011). Ainda, a sua capacidade de formar biofilme é um fator de permanência no ambiente determinante na contaminação por fômites e equipamentos na indústria (CASTELIJN et al., 2013).

Pertence ao Grupo O:4 (B) na classificação de acordo com antígenos

somáticos, flagelares, sendo um dos grupos com maior número, diversidade de sorotipos e linhagens diferentes (GRIMONT & WEILL, 2007).

Em países como China (YANG et al., 2013), Inglaterra (MUELLER-DOBLIES et al., 2013), Portugal (GOMES-NEVES et al., 2012) e Alemanha (METHNER et al., 2011), é o sorotipo mais isolado em carcaças de suínos, semelhante aos achados no Brasil, onde todos os estudos que determinam sua prevalência ou incidência de maneira significativa em abatedouros e carcaças de suínos definiram este sorotipo como o mais encontrado (BESSA, 2006; CASTAGNA et al., 2004; BOROWSKY et al., 2006; KICH et al., 2011; MULLER et al., 2009).

A ampla distribuição do sorotipo Typhimurium no ambiente e a diversidade de seus reservatórios constituem obstáculos à determinação da origem exata da bactéria dentro da cadeia produtiva (SWANENBURG et al., 2011). Estudos feitos por FEDORKA-CRAY et al. (1994) caracterizaram a salmonelose por sorotipo Typhimurium em suínos, verificando a ocorrência de doença debilitante em animais primoinfectados e com possível isolamento da bactéria em fezes e tonsilas em até três semanas após a infecção. Em estudos experimentais foi determinada a necessidade de uma dose infectante de 107 UFC/g da bactéria para que haja contaminação do suíno (KICH & CARDOSO, 2012).

Infecções por *Salmonella* Typhimurium em humanos são muito comuns, sendo sua prevalência variável de acordo com os países (EFSA, 2009). Em alguns países supõe-se que o sorotipo seja responsável por 20 a 30% das infecções em humanos, todas originadas pelo consumo de produtos de origem suína (STEINBACH & HARTUNG, 1999).

Salmonella Enteritidis é o segundo sorotipo mais isolado em suínos no mundo, sendo também um dos mais estudados pela sua capacidade de infectar amplo espectro de animais e por apresentar linhagens multirresistentes a desinfetantes e antimicrobianos comuns (HOTOON et al., 2011). Pertence ao Grupo O: 9 (D1), o mesmo ao qual pertence o sorotipo Gallinarum, ambos possuem estruturas muito semelhantes com a presença de fímbria específica determinante na sua patogenicidade ao hospedeiro (BORGES, 2011).

Em países da União Europeia, a prevalência atinge cifras superiores a 50% em núcleos reprodutores de suínos, por isso nestas localidades o sorotipo é de alta relevância e demanda estudos (EFSA, 2009). No Brasil, sua prevalência não é determinada, mas de acordo com o isolamento em carcaças de abatedouros e em granjas de suínos em ciclo completo o sorotipo Enteritidis está presente na maioria dos ensaios (BOROWSKY et al., 2006; KICH et al., 2011; MULLER et al., 2009).

O sorotipo Enteritidis é frequentemente associado a aves de produção e seus respectivos produtos, entretanto em diversos países a sua presença em granjas de suínos é frequente (EFSA, 2009). Pequenos roedores são os principais reservatórios por isso a presença de outros animais ou outras criações concomitantes determina um fator de risco evidente para a contaminação de suínos com este sorotipo, mas a transmissão geralmente ocorre por meio da ingestão de alimentos contaminados, sendo que a contaminação entre animais e humanos também pode ocorrer (GILLESPIE et al., 2005).

O contato com as fezes de animais infectados, limpeza e desinfecção inadequada das instalações, introdução de animais portadores no rebanho e fornecimento de ração contaminada com *Salmonella* spp. são fatores importantes na disseminação do microrganismo para os suínos (HIRSH, 1990; SOBESTIANSKY et al. 1999). A utilização de farinhas de origem animal é apontada como principal fonte de introdução de *Salmonella* spp. em rebanhos (NASCIMENTO; SILVA, 1994).

Roedores e outros animais presentes em propriedades, bem como a água e ambiente compõe importantes fatores para a epidemiologia da infecção dos suínos. Embora a *Salmonella* spp. possa sobreviver por longos períodos no ambiente, é aceito que os animais portadores são a maior fonte de infecção, tanto para outros animais como para humanos (WRAY; SOJKA, 1977).

Vários tipos de portadores têm sido identificados: portadores ativos, que excretam *Salmonella* spp. por meses ou anos; portadores passivos são animais que ingerem *Salmonella* spp. mas há pouca ou nenhuma invasão de linfonodos mesentéricos; portadores latentes que são os animais que têm *Salmonella* spp. em seus tecidos, mas geralmente não excretam este microrganismo nas fezes. Certos fatores de estresse podem promover a excreção de *Salmonella* spp. por animais portadores, bem como, levar à ativação ou reativação da infecção nestes animais (WRAY; SOJKA, 1997).

O transporte para abatedouros reduz a resistência do animal (LÁZARO; HOFER, 1997), levando-o a excretar o microrganismo (WILCOCK; SCHWARTZ, 1993). Desta forma facilita a transmissão oro-fecal de *Salmonella* spp. (LÁZARO et al. 1997). A infecção durante o transporte para o frigorífico ocorre se houver insuficiente limpeza e desinfecção dos caminhões, ou quando outros suínos estão excretando no mesmo caminhão. Tem sido demonstrado que a proporção de suínos no rebanho que excretam *Salmonella* spp. pode ser aumentada após o transporte (WILLIAMS; NEWELL, 2001). Os suínos podem também se infectar nas baias de espera dos frigoríficos. A espera é um local onde suínos de muitas granjas, são reunidos, permitindo maior oportunidade para suínos livres de *Salmonella* spp. entrarem em

contato direto ou indireto com os animais excretores, resultando em infecção (SWANENBURG, 2001).

A prevenção é a melhor forma de controle da *Salmonella* spp. (BORCH et al. 1996), proporcionando maior segurança microbiológica ao alimento (BLAHA, 1996), um menor risco à saúde pública, e a ampliação das áreas de comercialização dos produtos de suínos (SCHWARTZ, 1996).

De acordo com a Resolução RDC nº. 12, a pesquisa de *Salmonella* spp. em produtos cárneos é feita de forma qualitativa, sendo o resultado expresso como presença ou ausência do microrganismo em 25g de alimento. Segundo a legislação vigente a presença desses microrganismos em 25g de alimento torna o produto impróprio para consumo humano (BRASIL, 2001).

2.5.2. *Staphylococcus coagulase positiva*

Os estafilococos são cocos Gram-positivos imóveis, não formadores de esporos e catalase positivos. Esses microrganismos ocorrem na forma de células isoladas, em pares, tétrades e cadeias curtas, porém aparecem predominantemente em grupos semelhantes a cachos de uva e são em sua maioria anaeróbios facultativos polares (KONEMAN et al., 2008)

O gênero *Staphylococcus* é formado por 41 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2009). Entre as bactérias desse gênero, *S. aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar em razão da sua capacidade de produzir enterotoxinas (EE) (CENCI-GOGA et al., 2003). Vinte e duas EE já foram descritas e 10 foram envolvidas com intoxicação alimentar (EEA, EEB, EEC1, EEC2, EEC3, EED, EEE, EEG, EEH e EEI) (CENCI-GOGA et al., 2003). Embora a maioria dos casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica seja atribuída às EE clássicas (EEA à EEE) (CHEN et al., 2004), o recente avanço dos métodos de diagnóstico permitiu a identificação de casos de intoxicação alimentar envolvendo EEG, EEH e EEI, indicando que a importância das “novas” EE pode estar sendo subestimada (CHEN et al., 2004; CENCI-GOGA et al., 2003).

Em *S. aureus*, diversos genes codificadores de fatores de virulência estão presentes em elementos genéticos móveis, tais como ilhas de patogenicidade (SaPI), profagos e plasmídeos (JARRAUD et al., 2001). Dentre as quatro ilhas de patogenicidade descritas em *S. aureus*, SaPI3 tem grande importância por reunir genes de EE em um cluster denominado enterotoxina gene cluster ou cluster egc, o

qual agrupa os genes codificadores de EEG (seg), EEI (sei), EEIM (selm), EEIN (seln) e EEIO (selo) (JARRAUD et al., 2001; BELKUM et al., 2006).

Esse cluster é descrito por alguns autores (JARRAUD et al., 2001; THOMAS et al., 2006) como “berço das EE”, em que, a partir de eventos de recombinação genética, poderia ser formado um novo gene codificador de um superantígeno estafilocócico capaz de causar intoxicação alimentar. Além disso, a possibilidade de ocorrer transferência horizontal de genes de EE do cluster *egc* entre distintas cepas de *S. aureus* também pode favorecer a evolução da bactéria e determinar o sucesso desse patógeno (JARRAUD et al., 2001; THOMAS et al., 2006).

Alimentos preparados com produtos de origem animal são os mais envolvidos em casos e/ou surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (CENCI-GOGA et al., 2003), portanto, a pesquisa de *S. aureus* nesses alimentos e a avaliação de seu potencial em produzir enterotoxinas são fatores extremamente importantes na investigação epidemiológica e em análises de risco para essa doença (LANCETTE; BENNETT, 2001).

As toxinas estafilocócicas se formam muitas vezes quando o alimento não sofre nenhum tipo de tratamento térmico ou se este for insuficiente, visto que o microrganismo suporta temperaturas de 60° a 70° C (EVANGELISTA, 2000).

Em função do risco à saúde pública que a presença de *S. aureus* em alimentos representa, estabeleceu-se a obrigatoriedade de sua pesquisa e enumeração em diversos países, como parte da fiscalização sanitária de órgãos governamentais (SILVA et al., 2004).

Nos alimentos, o grupo dos *Staphylococcus* coagulase positiva são importantes, por duas razões: sua presença em alimentos pode indicar deficiência no processamento e condições higiênicas inadequadas, e também porque a enterotoxina, uma vez presente no alimento, é termoresistente, sendo capaz de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização, podendo causar intoxicação alimentar. A coagulase produzida por algumas espécies de *Staphylococcus* é uma enzima extracelular que coagula o plasma sanguíneo e que é muito utilizada na rotina de testes para identificação do microrganismo em laboratório. Por conta das semelhanças entre as espécies de *Staphylococcus*, houve uma mudança na legislação brasileira, que passou a estabelecer a pesquisa e enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva ao invés da enumeração de *S. aureus* (SILVA et al., 2004).

Os manipuladores são a fonte mais importante de contaminação (HOLT et al., 1994). Neste contexto, o aquecimento do alimento após sua manipulação torna-se relevante na prevenção de toxinfecções (MOTTA et al., 2000)

2.5.3. Coliformes fecais totais, termotolerantes e *Escherichia coli*

Os coliformes fecais indicam contaminação de origem fecal recente do produto (MOTTA et al., 2000), sendo que a detecção de elevado número destas bactérias em um alimento, inclusive nos processados, é interpretada como possível presença de patógenos intestinais (PARDI et al., 1993). Os coliformes são microrganismos indicadores de condições sanitárias indesejáveis, principalmente em processamento de alimentos. A classificação dos coliformes é representada ainda pelo grupo de coliformes totais, que incluem as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou aeróbios facultativos, mesófilos, capazes de fermentar lactose com produção de gás, em 24-48h/35°C. Sua presença indica a qualidade higiênico-sanitária do produto (SILVA et al., 1997). Dentre estes, encontram-se um grupo de microrganismos amplamente estudado, os coliformes termotolerantes, que são indicadores de contaminação de origem fecal no processo de manipulação e armazenamento de alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2006).

Os coliformes termotolerantes diferenciam-se dos totais por fermentarem a lactose com produção de gás a uma temperatura de 44,5°C. O principal representante do grupo, e o indicador específico de contaminação fecal, é a *Escherichia coli* (TORTORA et al., 2005). Altas contagens de coliformes termotolerantes indicam falhas higiênicas ao longo do processamento e possibilidade da presença de microrganismos patogênicos. Visando a segurança dos alimentos, a contagem de coliformes termotolerantes, tem sido utilizada para avaliar as condições higiênico-sanitárias dos alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2006).

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa da família Enterobacteriaceae, não esporulada, anaeróbica facultativa, fermentativa, em sua maioria móvel (flagelos peritríquios) e pertence a microbiota entérica de mamíferos e aves. Crescem em temperaturas de 18 a 44 °C sendo 37 °C é a temperatura ideal (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

As linhagens patogênicas de *E. coli*, causadoras de infecções intestinais ou extraintestinais, abrigam numerosos fatores de virulência localizados em cromossomos, plasmídeos ou DNAs de bacteriófagos. A patogenicidade das cepas de *E. coli* está relacionada ao impacto cumulativo de um ou vários fatores de virulência, os quais servem para diferenciar cepas patogênicas de não patogênicas (JOHNSON, 1991). De acordo com NATARO & KAPER (1998) várias grupos patogênicos distintos de *E. coli* diarreiogênicas são reconhecidos, sendo cada grupo definido por um conjunto de determinantes associados à virulência que agem para determinar os

aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos da doença que eles causam. KUHNERT et al. (2000) citam que a maioria dos genes encontrados em *E. coli* patogênica codificam vários fatores que determinam a virulência e o sorogrupo da linhagem.

Com base nos mecanismos de virulência específicos das cepas patogênicas, *E.coli* pode ser classificada em patotipos. São eles: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EaggEC), uropatogênica (UPEC), de meningite neonatal (NMEC); enteropatogênica para coelhos (REDEC) e patogênica para aves (APEC) (FERREIRA & KNÖBL, 2009). *E.coli* produtora de toxina Shiga (STEC) é um dos patotipos mais importantes para saúde pública. Embora sua maior característica seja a produção da shiga toxina, ela é atribuída a algumas doenças veiculadas aos alimentos, principalmente produtos cárneos (CADONA et al., 2013). Há também patotipos não causadores de diarreia, mas que causam infecções extra-intestinais (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000).

De acordo com o patotipo, com o sorogrupo e com a presença de genes de virulência as estirpes de *E.coli* podem causar desde quadro leves de diarreia até doenças septicêmicas graves. Adesinas, sistema de captação de ferro, invasinas, toxinas e os fatores, inibitórios do sistema imune do hospedeiro e genes de resistência a antimicrobianos são os genes mais importantes de virulência (VIEIRA, 2009).

Dentre as *E. coli* diarreio gênicas, o patotipo emergente em alimentos e de maior relevância é o formado pela *E. coli* produtora de toxina de Shiga. Essas bactérias são capazes de causar um amplo espectro de doenças no homem, que variam desde uma diarreia branda até doenças severas como colite hemorrágica (CH), os quais podem evoluir para complicações extra-intestinais graves, como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e a Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) (NATARO; KAPER, 1998).

A técnica de PCR tem se mostrado uma ferramenta indispensável para a identificação de genes de virulência em isolados bacterianos, uma vez que oferece a possibilidade de rápido diagnóstico nos casos específicos de infecções por *E. coli* (PASS et al., 2000).

2.5.4. Principais subgrupos de *E. coli* diarréiogênicas

2.5.4.1. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

De acordo com NATARO & KAPER (1998), a EPEC tem como principal reservatório o homem, raramente são encontradas em animais, e quando presentes, os sorotipos identificados não correspondem aqueles de humanos. Assim como outras *E. coli* diarréiogênicas a transmissão da EPEC é fecal-oral. KUHRNERT et al. (2000) relatam que usualmente a bactéria é transmitida pela água, alimentos contaminados e colonizam o intestino delgado. As bactérias aderem firmemente às vilosidades das células epiteliais intestinais e causam uma lesão típica, denominada lesão “attaching/effacing” ou lesão A/E (KAPER et al., 2004).

Os principais fatores de virulência das EPEC típicas incluem a fímbria BFP (“bundle-forming pili”); uma proteína chamada intimina; um aparelho de secreção do tipo III e várias proteínas secretadas. O gene *eae* que codifica a proteína intimina e o gene *esp* que codifica a secreção de proteínas envolvidas na sinalização celular encontram-se localizados em ilhas de patogenicidade, denominada região LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”). Um grande plasmídeo denominado EAF (“EPEC Adherence Factor”) abriga o agrupamento de genes *bfp* (“bundle-forming pili”) e regula a expressão de *eae*. BFP é um tipo de fímbria responsável pela ligação da EPEC nas células epiteliais e formação de microcolônias, um processo denominado de aderência localizada (LA) (NATARO & KAPER, 1998; KOBAYASHI et al., 2000; ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; TRABULSI et al., 2002; ZHANG, et al., 2002; CLARKE et al., 2001; KAPER et al., 2004).

Para VIDOTTO et al. (2000), diagnósticos de infecções por EPEC realizados por meio de métodos convencionais, tais como, os testes sorológicos são restritos quanto a sensibilidade e especificidade. Entretanto a utilização de técnicas moleculares como análise de sequências de DNA e a PCR (“Reação em Cadeia da Polimerase”), são considerados métodos de alta especificidade, portanto necessários para uma adequada caracterização de linhagens de EPEC associadas a episódios de diarreia em diferentes regiões.

De acordo com KOBAYASHI et al. (2000), no Brasil a diarreia ainda é um importante problema de saúde pública e em várias partes do país linhagens de EPEC tem sido isoladas de crianças com baixo nível sócio-econômico durante episódios de diarreia.

2.5.4.2. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

Segundo WOLF (1997), a diarreia causada por ETEC é muito semelhante à cólera, ambas resultam da ingestão de grande quantidade do inóculo da bactéria que então coloniza o intestino delgado e passa a produzir toxinas que causam a secreção de líquido para dentro da luz intestinal.

Para VICENTE et al. (2005), a virulência das linhagens de ETEC é devido a habilidade da bactéria de produzir enterotoxinas e expressar adesinas de superfície que permitem a colonização das células do epitélio intestinal. Os principais fatores de virulência das ETEC são as enterotoxinas LT e ST e as adesinas (ECHEVERRIA et al., 1993). Dois diferentes grupos de enterotoxinas são produzidas por ETEC, as toxinas termo lábeis (LT-I e LT-II) codificadas pelos genes *eltI* e *eltII*, respectivamente, e as toxinas termoestáveis (STa e STb) codificadas pelos genes *stIA* e *stIB* (KAPER et al., 2004). Os genes que codificam as enterotoxinas LT e ST de ETEC estão localizados em plasmídeos (ECHEVERRIA et al., 1993).

As toxinas LT-I e STa são produzidas por cepas de *E. coli* isoladas de seres humanos, já as toxinas LT-II e STb são produzidas por cepas de *E. coli* isoladas de animais, mas atualmente já existem relatos do isolamento de cepas *E. coli* produtoras destas toxinas em seres humanos (TRABULSI et al., 2002; KAPER, et al., 2004).

2.5.4.3. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Segundo CLARKE (2001), o principal componente de virulência desse grupo é a produção de uma toxina que tem atividade citotóxica sobre células Vero e, é denominada Verotoxina (VT), essa toxina também é reconhecida como toxina Shiga (Stx) ou toxina "Shiga-like" (SLT), devido sua similaridade com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*. A toxina Shiga foi primeiramente identificada em *S. dysenteriae*. Essa proteína é codificada por um gene cromossomal que pode ser facilmente transferido para linhagens de *E. coli* por intermédio de bacteriófagos (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002).

Dois principais grupos antigênicos distintos da toxina ocorrem e são identificados como *Stx1* que é similar a toxina tipo I de *S. dysenteriae*, e a *Stx2* que apresenta 11 variantes distintas (PATON & PATON, 1998; GARCIA –ALJARO et al., 2005). Portanto, o subgrupo da espécie que comumente é denominado *E. coli*

enterohemorrágica (EHEC), é também nomeado de *E.coli* produtora de toxina Shiga (STEC) ou *E. coli* verocitotoxigênica (VETEC) (CAPRIOLI et al, 2005; GARCIA–ALJARO et al., 2005).

Os genes *stx1* e *stx2*, responsáveis pela produção das toxinas *Stx1* e *Stx2* respectivamente, estão localizados no genoma de um bacteriófago que se integra no cromossomo das STEC. A presença destes genes em fagos permite a sua disseminação entre diferentes estirpes, assim como possibilita que os genes coexistam em uma mesma bactéria, desta forma, as STEC podem apresentar um ou mais genes *stx* simultaneamente (PATON; PATON, 1998).

Embora o principal fator de virulência das STEC seja a produção de um ou mais tipos de Stx (*Stx1*, *Stx2* ou variantes), outros fatores associados à doença humana já foram descritos (GYLES, 2007) e são frequentemente utilizados para caracterizar um subgrupo de STEC, formado pelas *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) (CAPRIOLI et al., 2005). Dentre as STEC, o sorotipo O157:H7 é o que apresenta maior expressão epidemiológica. Este sorotipo foi reconhecido como patógeno em 1982, quando foi associado a dois surtos de colite hemorrágica de origem alimentar nos Estados Unidos (RILEY et al., 1983). Os surtos foram relacionados ao consumo de hambúrgueres de carne bovina (WELLS et al., 1983).

As EHEC são encontradas nas fezes da maioria dos animais domésticos, mas em termos de infecção humana o reservatório mais importante é o gado bovino aparentemente saudável (CLARKE, 2001; TRABULSI et al., 2002). A transmissão da bactéria pode ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados, tais como, carnes, leite não pasteurizado, água, pelo contato pessoal, ou transmitida por animais (CLARKE, 2001). A causa mais comum de infecção tem sido a ingestão de carnes mal passadas principalmente de origem bovina. Nos últimos anos vem aumentando o envolvimento de outros veículos de transmissão entre eles água de recreação e da rede pública, vegetais, frutas e sucos fermentados (TRABULSI et al., 2002)

Outro fator de virulência em cepas de EHEC é a produção de uma enterohemolisina (EHEC-Hly ou Ehx), utilizada como marcador de patogenicidade (BEUTIN et al., 1989). Essa enterohemolisina é codificada pelo gene *hly*, também denominado por alguns autores de gene *ehxA*, contido em um plasmídio de virulência (pEHEC) de 60-Mda. A enterohemolisina é uma proteína que atua destruindo eritrócitos, leucócitos, células endoteliais, granulócitos, monócitos e linfócitos T humanos, através da formação de pequenos poros. Apesar de haver uma forte associação entre a produção de enterohemolisina e de Stx com a colite hemorrágica e a SHU (SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995), o papel da enterohemolisina na patogenicidade de cepas de EHEC não está elucidado (MAINIL;

DAUBE, 2005; SAITOH et al., 2008). A liberação de hemoglobina dos eritrócitos pela ação da enterohemolisina pode ser uma explicação para o papel de *ehxA* na patogênese EHEC, pois o ferro da hemoglobina age estimulando a multiplicação do microorganismo no hospedeiro (SAITOH et al., 2008).

O consumo de água ou alimentos contaminados, o contato direto e indireto com animais infectados, e a disseminação pessoa-pessoa constituem as principais vias de transmissão das STEC. Portadores humanos já foram relatados e podem ser fontes de contaminação. A dose infecciosa estimada é extremamente baixa, inferior a 100 células (CAPRIOLI et al., 2005; MAINIL; DAUBE, 2005).

E. coli O157 é considerada transitória da flora intestinal do gado e sua presença nas fezes parece ser influenciada pela idade do animal e pela sazonalidade, sendo maior nos meses quentes (CAPRIOLI et al., 2005). As cepas de STEC podem sobreviver por longos períodos nas fezes de animais, em água contaminada, solo e superfícies de aço inoxidável e plástico (ERICKSON; DOYLE, 2007).

O primeiro isolamento de *E. coli* O157:H7 em amostras clínicas no Brasil foi relatado por Irino et al. (2002). A cepa foi isolada em 1990 de uma paciente de 18 anos de idade que apresentou diarreia e era portadora do vírus HIV. Já o primeiro relato de isolamento de cepa de STEC relacionada com Síndrome Hemolítica Urêmica, ocorreu em 2001, em São Paulo (GUTH et al., 2002).

Cerqueira et al. (1999) descreveram o primeiro isolamento de *E. coli* O157:H7 no Brasil, procedente de *swab* retal de gado, no Estado do Rio de Janeiro. Dados de isolamento de STEC em alimentos são extremamente limitados (BERGAMINI et al., 2007; CERQUEIRA; TIBANA; GUTH, 1997; RODOLPHO; MARIN, 2007) e não foram encontrados relatos sobre a pesquisa dessas bactérias em amostras de carnes suínas e de aves.

2.5.4.4. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC são definidas como um grupo de *E. coli* que se adere em determinadas linhagens celulares cultivadas *in vitro*, como as células Hep-2 e HeLa num padrão de adesão denominado “stacked-brick” (NATARO & KAPER, 1998).

As amostras EAEC são genética e fenotipicamente heterogêneas devido a algumas apresentarem as fímbrias AAF/I e/ou AAF/II, e diversas toxinas. Dentre estas toxinas, duas são codificadas no mesmo “lócus” cromossômico, em fitas separadas. Um gene codifica para uma protease que possui atividade mucolítica, chamada PiC

(“protein involved in intestinal colonization”). A fita oposta codifica uma enterotoxina que é conhecida como Shigella “enterotoxin” 1 (SHET1), estando presente na maioria das linhagens de *Shigella flexneri*. Uma Segunda enterotoxina descrita é a EAST-1, codificada pelo gene *astA*, presente em 40% das amostras de EAEC. EAST-1 é uma enterotoxina termoestável homóloga a STa de ETEC. Muitas cepas EAEC secretam uma toxina chamada PET (“Plasmid-encoded toxin”), que é codificada por um plasmídeo de virulência. PET possui atividade enterotóxica, provocando alterações no citoesqueleto e arredondamento celular pela clivagem da proteína do citoesqueleto espectrina (KAPER et al., 2004).

A patogênese de EAEC envolve três estágios: aderência na mucosa intestinal por meio das fímbrias de aderência agregativa (AAF) ou outros fatores de aderência; aumento da produção de muco pela bactéria formando biofilme; produção de toxinas e processo inflamatório, resultando em lesões na mucosa intestinal (NATARO & KAPER, 1998).

Segundo TRABULSI et al. (2002), números crescentes de relatos epidemiológicos associando EAEC à doença diarreica aguda tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, demonstram que EAEC é considerada um patógeno emergente.

2.5.4.5. *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

A patogênese de EIEC/*Shigella* compreende penetração nas células epiteliais (células M), seguido de lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento através do citoplasma e invasão basolateral para as células adjacentes (NATARO & KAPER, 1998).

Os genes requeridos para o mecanismo de patogenicidade estão presentes em um plasmídeo (pInV) encontrado em EIEC e em *Shigella*. Um terço deste plasmídeo é composto por sequências de inserção (IS), as quais são muito importantes para a evolução do plasmídeo de virulência. Este plasmídeo codifica fatores de virulência como as múltiplas proteínas do sistema de secreção do tipo III, responsáveis por eventos de sinalização, rearranjos do citoesqueleto, lise do vacúolo endocítico e outras ações (KAPER et al., 2004). Embora o sistema de secreção tipo III seja essencial para as características invasivas de EIEC, fatores de virulência adicionais, tais como, serina protease (SepA), sistema de aquisição de ferro e outras proteases têm sido descritas (NATARO & KAPER, 1998)

2.5.5. *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* constitui-se de bastonetes curvos em forma de vírgula, "S" asa de gaivota ou espiral, cujas dimensões variam entre 0,2 a 0,9 µm de largura por 0,5 a 5 µm de comprimento. São bactérias Gram-negativas, microaerófilas, não hemolíticas, não esporuladas e com colônias frequentemente não pigmentadas. Células em cultura mais de 48 horas tendem a assumir formas esféricas ou cocóides. "São móveis por meio de flagelo em uma ou ambas as extremidades, com movimento característico em "serrote" ou saca-rolha", que pode ser observado claramente em microscópio de contraste de campo escuro. Apresentam metabolismo do tipo respiratório e não utilizam carboidratos como fonte de carbono (VANDAMME; DE LEY, 1991; HOLT et al., 1994, CALIL et al., 2008).

O gênero *Campylobacter* é composto por 25 espécies. As espécies patogênicas ao homem são termofílicas, multiplicando-se bem em temperaturas mais elevadas, de 46°C (máxima) a 30°C (mínima). Entre as espécies termofílicas, *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*, são responsáveis pela maioria das infecções entéricas. O *C. jejuni* é a espécie mais comum, responsável por 80 a 85% dos casos, enquanto *C. coli* é responsável por 10 a 15% (MOORE et al., 2005). Entretanto, em países em desenvolvimento, *C. upsaliensis* também é considerado relevante (HUMPREY; O'BRIEN; MADSEN, 2007).

Demais fontes de transmissão de *Campylobacter* spp. também devem ser enfatizadas, como as ambientais, incluindo vegetais, insetos e água não clorada contaminada por fezes de animais, onde poucos estudos têm considerado a possibilidade de disseminação do microrganismo, particularmente pelos alimentos de origem não animal (KUMAR et al., 2001; CLARCK et al., 2003; CARVALHO et al. 2010).

O período de incubação da infecção por *Campylobacter* spp., a campilobacteriose, são de dois a cinco dias, podendo chegar até dez dias. Os sintomas variam de diarreia profusa aquosa (*cholera-like*) à diarreia sanguinolenta, contendo muco e células sanguíneas brancas (*dysentery-like*). Aproximadamente metade dos pacientes com a infecção inicialmente tem febre, mal estar, mialgia e dor abdominal, e posteriormente apresentam diarréia sanguinolenta. Estima-se que a dose infectante seja baixa, em torno de 400 a 500 células (BUTZLER, 2004; PADUNGTON; KANEENE, 2003).

Diversas complicações locais, como colecistite, pancreatite, peritonite e hemorragia gastrointestinal maciça, decorrentes da disseminação direta da bactéria

pelo trato intestinal, podem ocorrer. As manifestações extra-intestinais são raras, mas podem estar associados à meningite, endocardite, artrite séptica, osteomielite, septicemia neonatal (ALLOS, 2001) e miopericardite (ALZAND et al., 2010).

A seqüela mais importante da campilobacteriose, principalmente por *C. jejuni*, é a síndrome de Guillain-Barré (GBS) (HELMS; SIMONSEN; MOLBAK, 2006; NACKAMKIN, 2002). A GBS é uma doença auto-imune aguda caracterizada pela desmielização do sistema nervoso periférico, causando paralisia ascendente que pode afetar os nervos periféricos e craniais (ZILBAUER et al., 2008). Na maioria dos países desenvolvidos, *Campylobacter* spp. é o principal responsável pelas infecções zoonóticas entéricas humanas (HELMS; SIMONSEN; MOLBAK, 2006).

Muitos casos de campilobacteriose (3 a 50%) são associados com diarreia do viajante e resultam do consumo de água ou alimentos contaminados (BUTZLER, 2004). Carnes cruas ou mal cozidas, hambúrgueres, linguiças e ostras já foram alimentos implicados em surtos por *Campylobacter* spp. (BUTZLER, 2004; HORROCKS et al., 2009).

Embora os mecanismos pelos quais *Campylobacter* spp. causa a doença ainda não sejam totalmente compreendidos, sabe-se que vários fatores de virulência podem estar envolvidos, tais como: a toxina citolética distensora (CDT), adesinas, proteínas de invasão, cápsulas, flagelos e lipooligossacarídeos. A dificuldade no esclarecimento da patogênese deve-se, principalmente, à falta de um modelo animal adequado para a reprodução da doença humana (POLY; GUERRY, 2008; YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007; ZILBAUER et al., 2008). O entendimento da patogênese é também dificultado pela variabilidade genética das cepas (POLY; GUERRY, 2008). Todos os animais, inclusive os domésticos, podem ser portadores do patógeno, mas as aves, particularmente os frangos, constituem a maior fonte de transmissão da infecção ao homem (BUTZLER, 2004). O consumo de carne de frango e derivados inadequadamente processados é o principal fator de risco na campilobacteriose humana (HUMPHREY; O'BRIEN; MADSEN, 2007; MOORE et al., 2005). Na maioria dos países, a frequência de *Campylobacter* spp. em carne de frango é de no mínimo 50% (SUZUKI; YAMAMOTO, 2009), podendo chegar a 100% (HUMPHREY; O'BRIEN; MADSEN, 2007).

Em carne bovina, a espécie prevalente é *C. jejuni*, enquanto na carne suína a prevalência é de *C. coli* (HORROCKS et al., 2009). A frequência do patógeno em carnes bovina e suína geralmente é baixa, e inferior a 10%, devido à manutenção prolongada das carcaças em temperatura de refrigeração antes do processamento e à redução do número de bactérias ao longo das várias etapas do processamento (HUMPHREY; O'BRIEN; MADSEN, 2007; MEDEIROS et al., 2008; TAREMI et al.,

2006; WONG et al., 2007).

As informações sobre a ocorrência de *Campylobacter* spp. em animais de corte e alimentos de origem animal em países em desenvolvimento ainda são muito limitadas (PADUNGTON; KANEENE, 2003). No Brasil, os estudos publicados referem-se à detecção de *Campylobacter* termofílicos em carne de frango, especialmente carcaças de frango recém-abatidas (DIAS et al., 1990; PINHEIRO, 1991), cortes de frango (AQUINO et al., 1996), carcaças de frango adquiridas diretamente de uma planta processadora de frangos (CASTRO et al., 1997, AQUINO et al., 2002) e, em amostras de carcaças (AUGUSTO FILHO, 2001) e cortes de frango (CARVALHO et al., 2010; CORTEZ, 2003; SAKUMA; FRANCO; FERNANDEZ, 1992) comercializados no varejo. São escassos os estudos referentes à detecção da bactéria em produtos cárneos de origem bovina e suína.

2.5.6. *Listeria* spp.

O gênero *Listeria* consiste em bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, em forma de bastonetes irregulares. Durante muitos anos, o gênero *Listeria* era formado por oito espécies – *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. denitrificans*. Com base na sequência do RNAr 16S de *L. denitrificans*, esse microrganismo foi excluído do gênero *Listeria* e transferido para o gênero *Jonesia* com a denominação *Jonesia denitrificans* (KONEMAN, 2008)

O meio científico foi alertado para o perigo da listeriose durante a década de 80, quando uma série de surtos ocorreu na América do Norte e Europa, e a *Listeria monocytogenes* foi responsável por várias formas de listeriose humana. A partir de 1988, principalmente nos países da Europa Central, pesquisadores começaram a investigar a listeriose como doença de origem alimentar (FABER; PETERKIN, 1991; OLIVEIRA, 1993).

Das espécies de *Listeria*, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* estão associadas com enfermidades no homem (VARNAM; EVANS, 1991). A *L. monocytogenes* desperta um maior interesse para saúde pública (VIDON et al., 2001), por estar envolvida em surtos de listeriose de origem alimentar em humanos. Contudo, usualmente, a presença de qualquer espécie do gênero *Listeria* em alimentos é um indicador de condições precárias de higiene (PEREIRA; ROCOURT, 1993; COCOLIN et al., 2002).

Listeria spp. encontra-se amplamente distribuída na natureza, fato que explica a facilidade com que é encontrada em alimentos, desde a produção até o consumo. A pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo é de grande importância, pois se sabe que os alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose são aqueles processados industrialmente, mantidos sob refrigeração, com vida de prateleira longa, e que oferecem condições adequadas para a sua multiplicação (BEUCHAT, 1996).

L. monocytogenes é uma bactéria ubíqua, com capacidade de se desenvolver em condições inóspitas para outros microrganismos patogênicos, que pode iniciar multiplicação em temperaturas que variam de 0 a 45°C (SWAMINATHAN, 2001).

Dentre os alimentos já envolvidos nos surtos de listeriose, têm-se leite cru e pasteurizado, queijos, carnes bovina, suína, de aves e seus derivados, frutos do mar, além de produtos de origem vegetal, crus ou processados, e refeições preparadas (FRANCO & LANDGRAF, 1996; RYSER; DONNELLY, 2001).

A listeriose é definida como uma zoonose que pode acarretar um quadro clínico severo com elevada taxa de letalidade. A doença passou a receber atenção significativa a partir dos episódios ocorridos nos Estados Unidos entre 1981 e 1985 (SCHLECH III et al., 1983) e a doença é transmitida por duas vias principais: contato com animais infectados e através da ingestão de alimentos contaminados (BELL; KYRIADES, 1998).

Diversas formas de transmissão do microrganismo a humanos já foram relatadas, mas a via alimentar parece ser a mais preocupante. Entretanto, o risco de desenvolver uma infecção por *L. monocytogenes*, após a ingestão de um produto contaminado, é baixo para a população em geral (CDC, 2013). A dose mínima de infecção não foi ainda estabelecida, mas informações sobre a população de *L. monocytogenes* em alimentos contaminados envolvidos em surtos indicam que populações entre 10^{-3} e 10^{-4} Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g de alimento foram responsáveis pela doença (DUFFYT et al., 1999).

A legislação brasileira determina a ausência de *L. monocytogenes* em 25 gramas de queijo, mas para outros alimentos, como produtos cárneos, ainda não existe um limite regulatório. Dada à frequência de *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos de origem suína, a sua detecção deveria ser levada em consideração na avaliação do risco de transmissão da listeriose para o ser humano, a partir de produtos cárneos (SANTOS et al., 2005). Critérios para níveis toleráveis de *L. monocytogenes* em produtos cárneos foram introduzidos em diversos países (GRAVANI, 1999). Entre estes, os Estados Unidos da América exige ausência de *L.*

monocytogenes em 25 g do alimento ("tolerância zero"), enquanto na Europa, foram recomendados limites quantitativos inferiores a 100 UFC/g (ANON, 1999).

2.6. Qualidade da água na indústria de alimentos

A qualidade da água utilizada na produção e manipulação de alimentos é constantemente negligenciada. De acordo com Hobbs e Roberts (1993), o fornecimento de água potável em abundância é necessário para a indústria de alimentos, uma vez que é importante via de transmissão de agentes patogênicos ao ser humano, tanto pelo seu consumo direto, como pela contaminação de alimentos e do ambiente de preparo dos mesmos. Galbraith et al. (1987), em estudos sobre doenças transmitidas por alimentos, realizados no Reino Unido, verificaram que 1.000 casos de doenças gastrointestinais foram causados por alimentos de origem animal contaminados por água poluída durante o processamento.

O controle da qualidade da água nos estabelecimentos que manipulam produtos cárneos é de grande importância, pois a carne e seus derivados são excelentes substratos para o desenvolvimento de microrganismos, inclusive os de veiculação hídrica.

Palumbo et al. (1999) inocularam *Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* na água utilizada em indústrias de processamento de carne e verificaram a sobrevivência desses microrganismos por 21 dias, enfatizando a importância do controle da qualidade da água na indústria de alimentos.

Van Hounten et al. (1998) referem-se a um surto de doença de origem alimentar em Livingston, EUA, causado por alimentos contaminados pela água durante sua preparação, sendo isoladas *Plesiomonas shigelloides* e *Salmonella* sorotipo Hartford da água e dos alimentos envolvidos. Portanto, Segundo Frazier e Westhoff (1978), toda a água que se coloca em contato com o alimento deve cumprir os mesmos padrões microbiológicos da água de consumo humano.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

Durante o período de março de 2013 a março de 2014 foram coletadas 100 amostras de embutidos cárneos de origem suína (linguiças tipo frescal) (Figura 1). Cinquenta amostras foram produzidas artesanalmente e adquiridas de feiras livres, supermercados e açougues localizados no Município de São Paulo e no interior do Estado e 50 produzidas em frigorífico com Inspeção Municipal localizado no Estado de São Paulo. Durante as visitas ao frigorífico foram também coletadas oito alíquotas de 200mL de água empregadas nas operações de produção dos embutidos. As amostras foram armazenadas em sacos estéreis descartáveis e transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo reciclável, a temperatura de até 8°C e foram processadas nos Laboratórios de Doenças Bacterianas da Reprodução e Laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico. As metodologias utilizadas para as técnicas de isolamento de *Salmonella* spp., contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e contagem de números mais prováveis de coliformes totais e termotolerantes foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.



Figura 1: Amostras de linguiça suína frescal artesanal coletadas em feiras de rua, açougues e supermercados.

3.2. Metodologia para cultivo de *Salmonella* spp.

Para cada 25g \pm 0,2 g da amostra de linguiça foi adicionado 225 ml de solução salina peptonada 1% tamponada, e para cada 100mL da água coletada no frigorífico foi adicionado 50mL da solução salina peptonada 1% tamponada dentro de sacos plásticos estéreis. As amostras foram homogeneizadas por aproximadamente 60 segundos no Stomacher 400 Circulator (Seward) e incubadas a 36°C por um período de 16 a 20 horas. A partir desse procedimento de pré-enriquecimento inocularam-se em meios de enriquecimento seletivos alíquotas de 0,1 mL das amostras em tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis e alíquotas de 1,0 mL em tubos contendo 10 mL de caldo Tetratonato, As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas.

A partir dos caldos seletivos de enriquecimento, foi repicado sobre a superfície de placas com cada meio sólido seletivo, estriando de forma a se obter colônias isoladas. Dessa forma foram obtidas duas placas de ágar MacConkey (MC) Difco®, uma originária do caldo Rappaport Vassiliadis Difco® e outra do caldo Tetratonato Difco® e duas placas do meio *Salmonella-Shigella* (SS) Difco® obtidas do mesmo modo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas.

Após a multiplicação, foram selecionadas três colônias suspeitas por amostra, conforme a característica típica de *Salmonella* spp. nos meios de cultura. No meio de MacConkey selecionaram-se colônias incolores (Figura 2), entre translúcidas e ligeiramente opacas, já no meio SS selecionaram-se colônias enegrecidas (Figura 3) (Brasil, 2003a). Essas colônias foram ressuspensas em 20 μ l de Nuclease Free Water para realização da PCR e identificação de *Salmonella* spp. que em casos positivos foram diferenciadas também pela técnica de PCR em *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella*. Typhimurium, *Salmonella* Choleraesuis e *Salmonella* Dublin (Quadros 2, 3, 4 e 5).

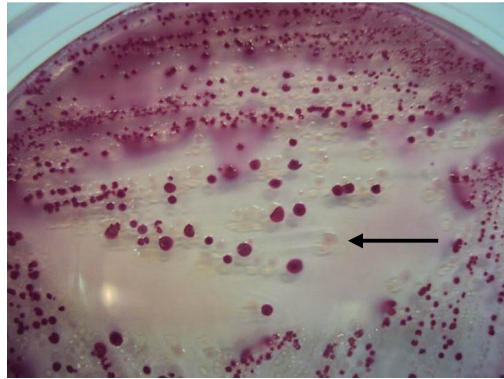


Figura 2: Ágar MacConkey (Difco®) contendo colônias bacterianas incolores (seta) suspeitas de *Salmonella* spp.

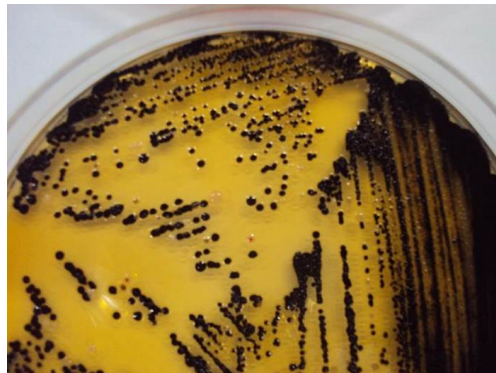


Figura 3: Ágar *Salmonella-Shigella* (Difco®) contendo colônias bacterianas enegrecidas suspeitas de *Salmonella* spp.

3.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para identificação de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Dublin* e *S. Choleraesuis*

Quadro 2: Sequência nucleotídica dos primers do gene *Inv A* de *Salmonella* spp. descritos por Cortez et al. (2006)

Gene alvo	Sequência de primers	Tamanho do amplicon	Espécie
<i>Inv A</i>	5' TTGTTACGGCTATTTTGACCA 3' 5' CTGACTGCTACCTTGCTGATG 3'	521pb	<i>Salmonella</i> spp.

Quadro 3: Sequência nucleotídica dos primers dos genes *fliC* e *sefA* de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium descritos por Soumet et al. (1999).

Gene alvo	Sequência de primers	Tamanho do amplicon	Espécie
<i>fliC gene</i>	5' CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT 3' 5' ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT 3'	559pb	<i>Salmonella</i> Typhimurium
<i>sefA gene</i>	5' AGG TTCAGGCAGCGGTTACT 3' 5' GGGACATTTAGCGTTTCTTG 3'	312pb	<i>Salmonella</i> Enteritidis

Quadro 4: Sequência nucleotídica dos primers dos genes *DSR1*, *DSR2* e *DSR3* de *Salmonella* Dublin descritos por Akiba et al. (2011).

Gene alvo	Sequência de primers	Tamanho do amplicon	Espécie
<i>DSR1</i>	5' ATCGGTGCTGGGTAATTTTG 3' AGGAACGAGAGAAACTGCTT	105pb	<i>Salmonella</i> Dublin
<i>DSR2</i>	5' ACGCGAAATCTGATGGTCTT 3' 5' GCCCACCAGTTGTGAAAGGC 3'	203pb	
<i>DSR3</i>	5' ATCACCTCGCAA ACTTGTC 3' 5' TCGGGCAATCAGGTCGCCGA 3'	296pb	

Quadro 5: Sequência nucleotídica dos primers dos genes *fliC-F* e *fliC-R* de *Salmonella* Choleraesuis descritos por Chiu et al. (2005).

Gene alvo	Sequência de primers	Tamanho do amplicon	Espécie
<i>fliC-F</i>	5' AAGGAAAAGATCATGGCACAA 3'	900pb	<i>Salmonella</i> Choleraesuis
<i>fliC-R</i>	5' GAACCCACCATCAATAACTTTG 3'		

Realizou-se a amplificação das amostras com a utilização de 10 µL da colônia ressuspensa em Nuclease Free Water acrescido de 40 µL da mistura de reagentes da PCR contendo 1,25 U taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, tampão (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM KCl); 2 mM MgCl₂ e 25 pmol de cada primer.

Nessas condições foram empregados os seguintes ciclos de temperaturas para

amplificação:

- ▶ Desnaturação inicial 95°C por 10 min.;
- ▶ 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min. (*Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Choleraesuis*) e 30 ciclos a 94°C por 1min. (*S. Dublin*);
- ▶ Hibridização 58°C por 1min. (*Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Choleraesuis*) e 60°C por 1min. (*S. Dublin*);
- ▶ Extensão a 72°C por 1min.;
- ▶ Extensão final de 72°C por 7 min.

As cepas de *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium* e *S. Dublin* utilizadas como controle positivo das reações são cepas da coleção do Laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico, já a cepa de *S. Choleraesuis* foi adquirida sob o número ATCC 7001 (Sorogrupo C), água deionizada estéril foi utilizada como controle negativo. Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 1 µL corante glicerinado (Blue juice – Invitrogen) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, adicionado de TBE 0,5X (0,0045 M TRIS-Borato e 1mM de EDTA ph 8,0), acrescido de 5 µl, 10 µl ou 20 µl de Gel Red (Nucleid Acid da Biotium) 10000X. O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm. A visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (300-320 nm) pelo sistema de fotodocumentação (Câmera Canon) e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

3.4. Metodologia para contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Para cada 25 ± 0,2 g da amostra de linguiça e 25mL da água coletada no frigorífico, foi adicionado 225 mL de solução salina peptonada 1% tamponada estéril (esta é a diluição 10⁻¹). Foram efetuadas três diluições (10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴), onde inóculou-se 0,1mL de cada diluição sobre a superfície de ágar Baird Parker da Difco® e com o auxílio de uma alça Drigalski espalhou-se o inóculo sobre toda superfície de placa, até sua completa adsorção. As placas foram incubadas a 36±1°C por 30 a 48 horas. Durante a leitura selecionou-se placas de 20 a 200 colônias (Figura 4), onde foram contadas colônias típicas (colônias brancas brilhantes)

Como testes complementares foram realizados prova da catalase, coloração de Gram das colônias e a prova da coagulase (Figura 5) com a utilização do teste Staphyclin da Laborclin®.

O resultado final foi expresso considerando-se os dois primeiros algarismos representativos, separados por vírgula. Os algarismos subsequentes, foram arredondados e transformados em potência de 10 (Brasil, 2003d).



Figura 4: Contagem de colônias típicas de *Staphylococcus* spp. em meio de cultura Ágar Baird Parker (Difco®).



Figura 5: Prova da coagulase das colônias de *Staphylococcus* spp. À esquerda resultado negativo e à direita resultado positivo para prova da coagulase (teste Staphyclin da Laborclin®)

3.5. Metodologia para contagem dos números mais prováveis de coliformes totais e termotolerantes

3.5.1. Prova presuntiva

Para cada 25g \pm 0,2 g de linguiça e 25mL da água coletada em frigorífico, foi adicionado 225mL de solução salina peptonada 1% tamponada estéril, sendo esta diluição 10^{-1} . A partir dessa diluição inicial (10^{-1}), inóculou-se volumes de 10mL em série de 4 tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio (LST) da (Difco®) que foi incubado a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas sendo a suspeita de coliformes totais indicada pela formação de gás nos tubos de Durhan.

3.5.2. Prova confirmatória

Foram repicados 10 μL com alças tipo “loop” descartáveis de cada tubo positivo de caldo LST obtido na prova presuntiva, para tubos contendo 10mL de caldo verde brilhante bile 2% lactose (VB) da (Difco®) para contagem de coliformes totais e tubos contendo 10ml de caldo EC para contagem de coliformes termotolerantes (Figura 6), todos os tubos continham tubos de Duhran invertidos. Os tubos de VB foram incubados a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas e a presença de coliformes totais e os tubos de EC foram incubados a $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas e a confirmação era observada pela formação de gás nos tubos de Duhran e anotados o número de tubos positivos em cada série de diluição. (Brasil, 2003b). A partir da combinação de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultado positivo em cada um dos testes confirmativos, foi verificado o Número Mais Provável na tabela de interpretação conforme (Quadro 6) (Brasil, 2003c).

Quadro 6: Número mais provável por grama ou mL, para séries de três tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL e respectivos intervalos de confiança 95%.

Número de Tubos Positivos			NMP/g ou mL	Intervalo Confiança (95%)	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<3,0	.-	9,5
0	0	1	3,0	0,15	9,6
0	1	0	3,0	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1000
3	3	0	240	42	1000
3	3	1	460	90	2000
3	3	2	1100	180	4100
3	3	3	>1100	420	.-

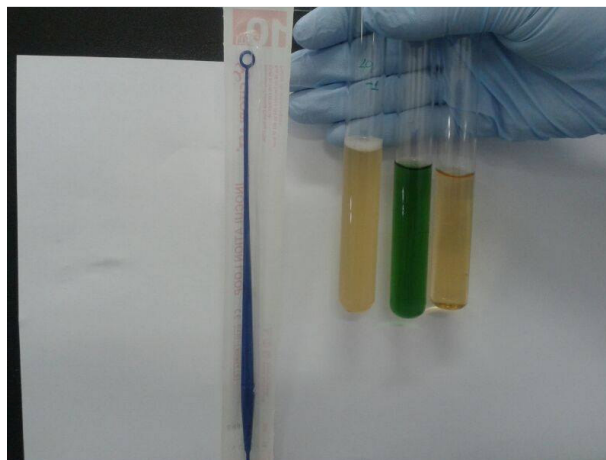


Figura 6: Da esquerda para direita, tubos de ensaio contendo 10mL dos meios líquidos LST, VB e EC (Difco®). À esquerda alça tipo “loop” descartável.

3.6. Metodologia para cultivo de *Escherichia coli*

Foram repicados 10 μ L com alças tipo “loop” descartáveis de cada tubo positivo de caldo EC, para placas contendo ágar EMB-Levine da (Difco®) e incubado a 37°C por 24 a 48 horas. Após a multiplicação, foram selecionadas colônias suspeitas conforme a característica típica de *E. coli* nesse meio de cultura apresentado coloração verde metálico (Figura 7). As colônias foram ressuspendidas em 20 μ L de Nuclease Free Water para detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* e *astA* por meio da técnica de PCR (Quadros 7 e 8).

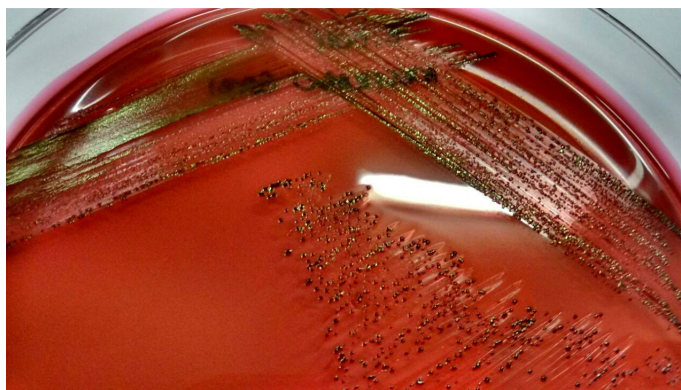


Figura 7: Meio de cultura Ágar EMB-Levine (Difco®) contendo colônias bacterianas de *Escherichia coli* apresentando coloração verde metálico.

3.7. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção dos diferentes genes de *Escherichia coli*

Quadro 7: Sequência nucleotídica dos primers para detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* e *astA* de *Escherichia coli* descritos Miyuki et al. (2013).

Gene alvo	Sequência de primers	Tamanho do amplicon
<i>stx1</i>	5' AGTTAATGTGGTGGCGAAGG 3' 5' CACCAGACAATGTAACGC 3'	347pb
<i>stx2</i>	5' TTCGGTATCCTATTCCCGG 3' 5' CGTCATCGTATACACAGGAC 3'	589pb
<i>eae</i>	5' CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC 3' 5' CCCGGATCCGTCTGCGCAGTATTCG 3'	881pb
<i>bfpA</i>	5' AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC 3' 5' GCCGCTTTATCCAACCTGGTA 3'	324pb
<i>aggR</i>	5' GTATACACAAAAGAAGGAAGC 3' 5' ACAGAATCGTACACCATCAGC 3'	254pb
<i>elt</i>	5' AACGTTCCGGAGGTCTTTATG 3' 5' CAACCTTGTGGTGCATGATG 3'	511pb
<i>esth</i>	5' TTCACCTTCCCTCAGGATG 3' 5' ACTGAATCACTTGACTCTTTCA 3'	172pb
<i>estp</i>	5' ACTGAATCACTTGACTTCTTCA 3' 5' TCACAGCAGTAAAATGTGTTGT 3'	120pb
<i>invE</i>	5' GCAGGAGCACATCTTGAAG 3' 5' GAAAGGCACGAGTGACTTTC 3'	208pb
<i>astA</i>	5' CCATCAACACAGTATATCCG 3' 5' ACGGCTTTGTAGTCCTTCA 3'	101pb

Realizou-se a amplificação das amostras com a utilização de 7 µL da colônia ressuspensa em Water Nuclease Free acrescido de 43 µL da mistura de reagentes da PCR contendo 1,25 U taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, tampão (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM KCl); 2 mM MgCl₂ e 25 pmol de cada primer.

Nessas condições foram empregados os seguintes ciclos de temperaturas para amplificação:

- ▶ Desnaturação inicial 95°C por 10 min.;
- ▶ 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min.;
- ▶ Hibridização 53°C por 1 min.;
- ▶ Extensão a 72°C por 1min.;
- ▶ Extensão final de 72°C por 10min.

As cepas de *E. coli* utilizadas como controle positivo das reações foram adquiridas do laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Butantã. As amostras protótipos são EAEC – 042 (O44:H18), DAEC – C1845, EGEC – EDL933 (O157:H7), ETEC – H10407 (O78:H11), EPEC típica – E2348/69 (O127:H6), EPEC atípica (sorogrupo O55:H7) e EIEC (sorogrupo O143), água deionizada estéril foi utilizado como controle negativo. Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 1µL corante glicerinado (Blue juice – Invitrogen) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, adicionado de TBE 0,5X (0,0045 M TRIS-Borato e 1mM de EDTA ph 8,0), acrescido de 5 µl, 10 µl ou 20 µl de Gel Red (Nucleid Acid da Biotium) 10000X. O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm. A visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (300-320 nm) pelo sistema de fotodocumentação (Câmera Canon) e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

Quadro 8: Principais patotipos diarreio gênicas de *E. coli* segundo Miyuki, et al. (2013).

	Patotipos	Genes
STEC	Produtora de Shiga toxina	<i>stx1, stx2 e eae</i>
EPEC	Enteropatogênica	<i>eae e bfpA</i>
EPEC	Atípica	<i>eae</i>
ETEC	Enterotoxigênica	<i>estp e astA ou esth, elt e astA</i>
EIEC	Enteroinvasiva	<i>inVE</i>
EAggEC	Enteroagregativa	<i>aggR e astA</i>

3.8. Metodologia para cultivo e identificação de *Campylobacter* spp.

Para cada 25g \pm 0,2 g de cada amostra de linguiça, foram adicionados 100mL de caldo BHI (Caldo Infusão Cérebro Coração) dentro de bolsas plásticas estéreis (Nasco), e submetidas à homogeneização por até quatro minutos em homogeneizador mecânico (Stomacher 80-Lab System). O homogenato obtido foi submetido a duas centrifugações sucessivas, 50mL do homogenato centrifugado a 3.000x g por 15 minutos (Super T21- Sorval), e 3mL do sobrenadante a 14.000 x g por 15 minutos (CASTRO et al., 1997; CARVALHO et al., 2010), sendo que a segunda centrifugação objetiva a concentração do agente. Após a segunda centrifugação, 2 mL do sobrenadante mais o “pellet”, foram filtrados em membrana de éster de celulose (Millipore) com poros de 0,65 μ m, utilizando-se suporte plástico (*swinex* - Millipore) e seringas estéreis, sendo que 100 μ L do filtrado foi semeado em meio de Ágar Brucella da Difco® acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (ABS), e 100 μ L (sem filtração) em meio seletivo (ABS-ATB) da Difco®, constituído por Ágar Brucella Sangue e suplementado com mistura antibiótica (DUFTY, 1967), composta por Polimixina B (1.000 UI/L), Cicloheximide (20 mg/L), Novobiocina (5mg/L) e Bacitracina (15.000 UI/L). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48-72 horas, a 37°C sob atmosfera de microaerofilia (10% O₂ + 5% de CO₂) (Figura 8). Após o período de incubação, as colônias suspeitas foram identificadas por métodos presuntivos: coloração de Gram, observação de mobilidade em microscópio de campo escuro e teste de oxidase; e, uma vez caracterizado o gênero *Campylobacter*, determinou-se as espécies e as subespécies pelas provas bioquímicas: catalase, formação de H₂S em TSI (meio de Tríplice Açúcar Ferro), hidrólise do hipurato, tolerância às temperaturas de 25°C e 42°C, susceptibilidade ao ácido nalidíxico (30 μ g) e à cefalotina (30 μ g) (SKIRROW et al, 1980; HOLT et. al.,1994; CARVALHO et al., 2010).

As amostras de água coletadas nos frigoríficos foram centrifugadas visando a concentração do agente, 50mL foram centrifugados a 3.000 RPM (Super T21- Sorval) por 15 minutos e três mL do sobrenadante foram centrifugados a 14.000 RPM (5415C-Eppendorff) por 15 minutos. O “pellet” de cada amostra obtido foi processado como descrito anteriormente, para as amostras de linguiça (CASTRO et al., 1997; OIE, 2008).

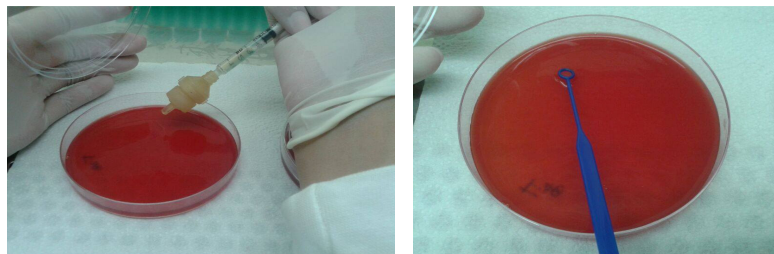


Figura 8: À esquerda filtragem do pellet em membrana de éster de celulose com poro de 0,65 μm e inoculação em meio de Ágar Brucella (Difco®). À direita inoculação da amostra não filtrada em meio de cultura ABS-ATB (Difco®).

3.9. Extração de DNA para pesquisa de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes*

Além do cultivo microbiológico para detecção de *Campylobacter* spp. também realizou-se a extração de DNA dos macerados iniciais das amostras para realização do PCR para detecção do *Listeria monocytogenes* (Quadro 9) e também para detecção de *C. jejuni* e *C. coli* (Quadro 10).

Suspensões de 1,5ml das amostras de linguiças maceradas e diluídas em 225 solução salina 0,85% estéril foram extraídas utilizando o protocolo de extração de DNA pelo reagente comercial DNAzol (Invitrogen ®) adaptado de Chomczynski (1993):

- ▶ Centrifugou-se a 2000rpm/ 5min. 1,5mL da amostra clínica.
- ▶ Transferiu-se 500 μl do sobrenadante para novos tubos.
- ▶ Centrifugou-se a 13.000rpm/ 20min.
- ▶ O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o pellet em 100 μL de TE.
- ▶ Foi adicionado 1 mL de DNAzol.
- ▶ A amostra foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 10.000rpm/10 min.
- ▶ Descartou-se o sobrenadante.
- ▶ Foi adicionado ao pellet 500 μL de etanol puro.
- ▶ Homogeneizou-se por inversão, até formar grumos brancos.
- ▶ Centrifugou-se a 4.000rpm/ 2min.
- ▶ O sobrenadante foi descartado por inversão.
- ▶ Adicionou-se ao pellet 850 μL de etanol 75%.
- ▶ Centrifugou-se a 4.000 rpm/ 2min.
- ▶ O etanol foi retirado com a pipeta e aguardou-se 20 segundos para evaporar.

- ▶ Ressuspender o pellet em 100µL de NaOH 8 mM.
- ▶ Adicionar 40µL de solução Hepes 0,1M para ajustar a solução de DNA para pH neutro.

3.10. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para identificação de *Listeria monocytogenes*

Quadro 9: Sequência nucleotídica dos primers para o gene da *Listeriolisina* para detecção de *Listeria monocytogenes* descritos por Blais et al. (1995).

Gene alvo	Sequência de primers	Tamanho do amplicon	Espécie
<i>Listeriolisina</i>	5' CATTAGTGGAAAGATGGAATG 3' 5' GTATCCTCCAGAGTGATCGA 3'	730pb	<i>Listeria monocytogenes</i>

Realizou-se a amplificação das amostras com a utilização de 10 µL do DNA extraído acrescido de 40 µL da mistura de reagentes da PCR contendo 1,25 U taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, tampão (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM KCl); 2 mM MgCl₂ e 25 pmol de cada primer.

Nessas condições foram empregados os seguintes ciclos de temperaturas para amplificação:

- ▶ Desnaturação inicial 94°C por 5 min.;
- ▶ 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min.;
- ▶ Hibridização 55°C por 1 min.;
- ▶ Extensão a 72°C por 1 min.;
- ▶ Extensão final de 72°C por 10min.

A cepa de *Listeria monocytogenes* utilizada como controle positivo foi adquirida sob o número ATCC 13932 (sorotipo 4b), água deionizada estéril foi utilizado como controle negativo. Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 1µL corante glicerinado (Blue juice – Invitrogen) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, adicionado de TBE 0,5X (0,0045 M TRIS-Borato e 1mM de EDTA ph 8,0), acrescido de 5 µl, 10 µl ou 20 µl de Gel Red (Nucleid Acid da Biotium) 10000X. O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm. A visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (300-320

nm) pelo sistema de fotodocumentação (Câmera Canon) e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

3.11. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

Quadro 10: Sequência nucleotídica dos primers dos genes *HIP400F*, *HIP1134R*, *CC18F* e *CC519R* de *C. jejuni* e *C. coli* descritos por Linton et al. (1997).

Gene alvo	Sequência de primers	Tamanho do amplicon	Espécie
<i>HIP400F</i>	5'-GAAGAGGGTTTGGGTGGTG-3'	735pb	<i>C. jejuni</i>
<i>HIP1134R</i>	5'AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG-3'		
<i>CC18F</i>	5'-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3'	500pb	<i>C. coli</i>
<i>CC519R</i>	5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'		

Realizou-se a amplificação das amostras com a utilização de 10 µL do DNA extraído acrescido de 40 µL da mistura de reagentes da PCR contendo 1,25 U taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, tampão (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM KCl); 2 mM MgCl₂ e 25 pmol de cada primer.

Nessas condições foram empregados os seguintes ciclos de temperaturas para amplificação:

- ▶ Desnaturação inicial 94°C por 5 min;
- ▶ 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min;
- ▶ Hibridização 66°C por 1 min;
- ▶ Extensão a 72°C por 1min;
- ▶ Extensão final de 72°C por 10min.

As cepas utilizadas como controle positivo das reações foram adquiridas sob os números ATCC 33291 (*C. jejuni*) e 43478 (*C. coli*), água deionizada estéril foi utilizada como controle negativo. Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 1µL corante glicerinado (Blue juice – Invitrogen) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, adicionado de TBE 0,5X (0,0045 M TRIS-Borato e 1mM de EDTA ph 8,0), acrescido de 5 µl, 10 µl ou 20 µl de Gel Red (Nucleid Acid da

Biotium) 10000X. O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm. A visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (300-320 nm) pelo sistema de fotodocumentação (Câmera Canon) e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

3.12. Interpretação dos resultados

As amostras foram analisadas de acordo com as características do alimento, conforme a Resolução RDC nº. 12 de 2001 da ANVISA (Quadro 11) (BRASIL, 2001) e OIE (2008).

Quadro 11: Interpretação para fim de aplicação de plano de amostragem

Grupo de Alimentos	Microrganismo	Tolerância para amostra indicativa	Tolerância para amostra representativa			
			n	c	m	M
Embutidos frescos (linguiças cruas e similares)	Coliformes a 45°C/g	5X10 ³	5	3	5X10 ²	5X10 ³
	<i>Staph. coag. pos./g</i>	5X10 ³	5	2	10 ³	5x10 ³
	<i>Salmonella sp./25g</i>	Ausente	5	0	Ausente	

m: é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável.

M: é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis

n: é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Nos casos nos quais o padrão estabelecido é ausência em 25g, como para *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* e outros patógenos, é possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral, respeitando-se a proporção p/v (uma parte em peso da amostra, para 10 partes em volume do meio de cultura em caldo).

c: é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes). Nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por "ausência", c é igual a zero, aplica-se o plano de duas classes.

A presença de *Campylobacter* spp. em 25g do alimento torna o produto impróprio para consumo humano (BRASIL, 2011).

3.13. Análise estatística

Para a comparação entre as amostras fiscalizadas e artesanais, com relação à proporção de amostras impróprias foi utilizado o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher (ZAR, 1999), com nível de significância de 5%. O programa estatístico utilizado nas análises foi o BioEstat 5.03.

4. RESULTADOS

4.1. Cultivo de *Salmonella* spp. e detecção de *Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Das 50 amostras de linguiças suínas frescas produzidas de forma artesanal constatou-se através do cultivo microbiológico e PCR a presença de *Salmonella* spp. em 6/50 (12%) amostras (Figura 9), sendo que 3/50 (6%) foram identificadas pela PCR como *Salmonella Typhimurium*, 1/50 (2%) (Figura 10) como *Salmonella Choleraesuis* e 2/50 (4%) (Figura 11) somente como *Salmonella* spp. Nenhuma das amostras de *Salmonella* spp. foi positiva para *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Dublin* (Figura 12).

Das 50 amostras de linguiças suínas produzidas sob inspeção, também foram obtidas amostras positivas, totalizando 3/50 (6%) detectadas como *Salmonella* spp., Dentre estas, apenas 1/50 (2%) foi classificada como *Salmonella Typhimurium* e as outras 2/50 (4%) foram identificadas somente como *Salmonella* spp. Nenhuma das amostras foi positiva para *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Dublin* e *Salmonella Choleraesuis* (Tabelas 1, 2, 3 e 4).

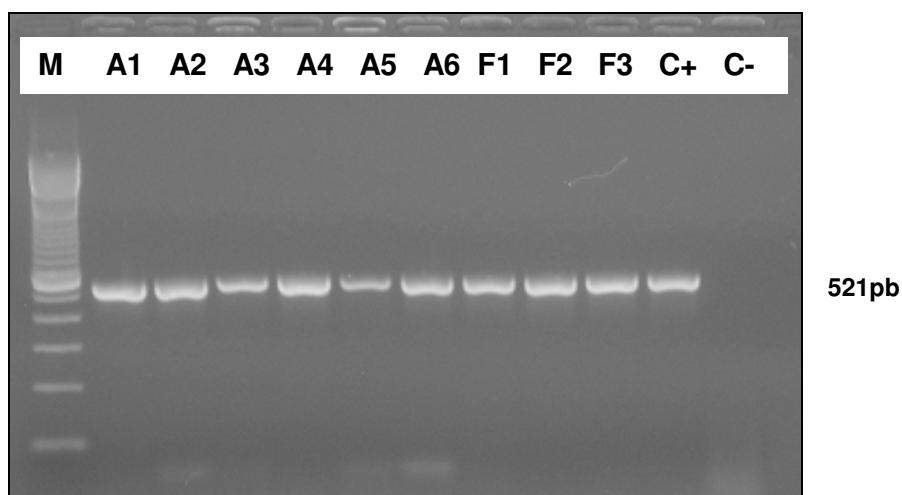


Figura 9: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Salmonella* spp. **M:** Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen); **A:** Amostras artesanais; **F:** Amostras fiscalizadas; **C+:** Controle positivo de *Salmonella* spp.; **C-:** Controle negativo; **pb:** pares de bases.

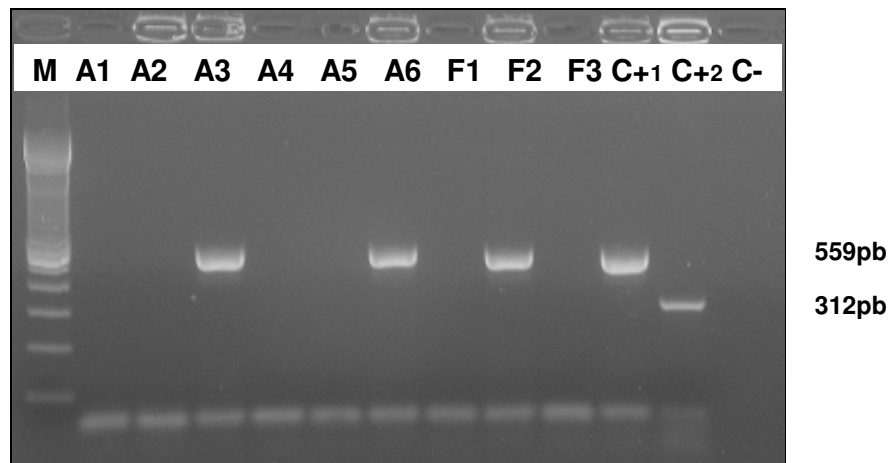


Figura 10: Resultados obtidos pela amplificação do multiplex PCR para detecção de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. **M:** Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); **A:** Amostras artesanais; **F:** Amostras fiscalizadas; **C+1:** Controle positivo de *S. Typhimurium*; **C+2:** Controle positivo de *S. Enteritidis* **C-:** Controle negativo; **pb:** pares de bases.

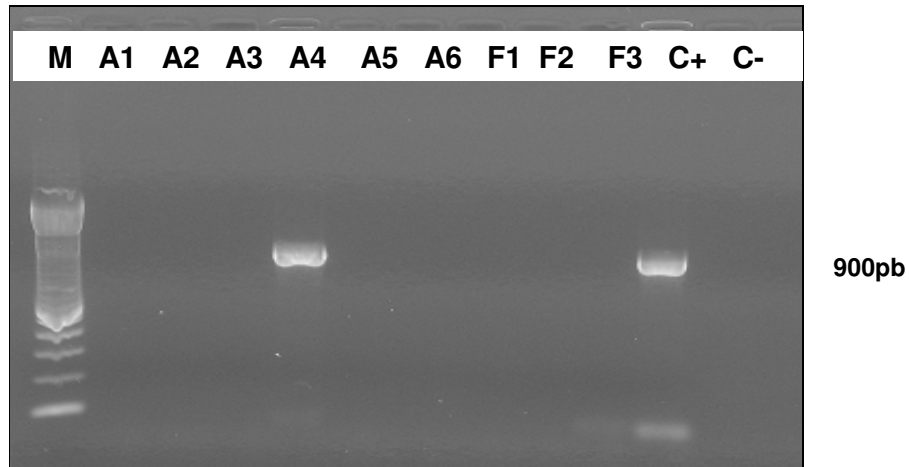


Figura 11: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Salmonella* Choleraesuis. **M:** Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); **A:** Amostras artesanais; **F:** Amostras fiscalizadas; **C+:** Controle positivo de *S. Choleraesuis*; **C-:** Controle negativo; **pb:** pares de bases.

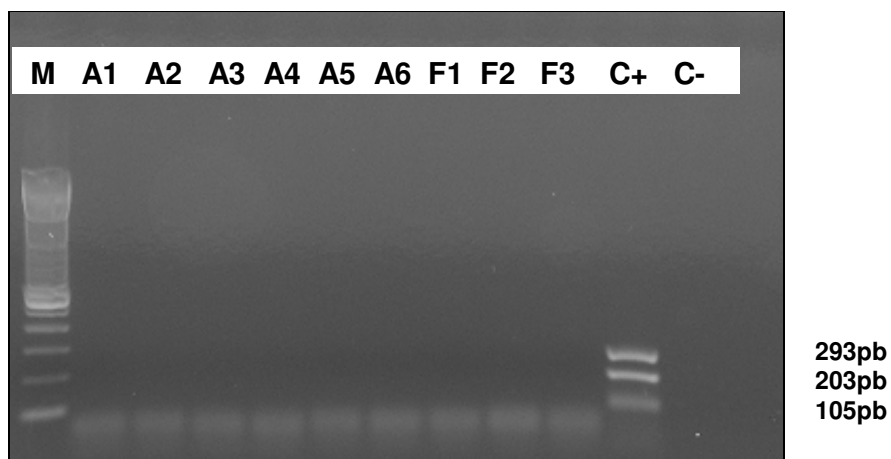


Figura 12: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Salmonella* Dublin. **M:** Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); **A:** Amostras artesanais; **F:** Amostras fiscalizadas; **C+:** Controle positivo de *S. Dublin.*; **C-:** Controle negativo; **pb:** pares de bases.

Tabela 1: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal artesanais contaminadas com *Salmonella* spp. impróprias para consumo. São Paulo, 2015.

<i>Salmonella</i> spp.		
Total de amostras	50	100%
Negativo	44	88%
Positivo	6	12%

Tabela 2: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal fiscalizadas contaminadas com *Salmonella* spp. impróprias para consumo. São Paulo, 2015.

<i>Salmonella</i> spp.		
Total de amostras	50	100%
Negativo	47	94%
Positivo	3	6%

Tabela 3: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal artesanais contaminadas com *Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* impróprias para consumo. São Paulo, 2015.

PCR <i>Salmonella</i>		
Total de amostras	50	100%
<i>S. Typhimurium</i>	3	6%
<i>S. Enteritidis</i>	0	0%
<i>S. Choleraesuis</i>	1	2%
<i>S. Dublin</i>	0	0%
<i>Salmonella</i> spp.	2	4%

Tabela 4: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal fiscalizadas contaminadas com *Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* impróprias para consumo. São Paulo, 2015.

PCR <i>Salmonella</i>		
Total de amostras	50	100%
<i>S. Typhimurium</i>	1	2%
<i>S. Enteritidis</i>	0	0%
<i>S. Choleraesuis</i>	0	0%
<i>S. Dublin</i>	0	0%
<i>Salmonella</i> spp.	2	4%

4.2. Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* UFC/g.

Das 50 amostras de linguiças suínas frescas analisadas produzidas de forma artesanal, 29/50 (58%) estão fora dos padrões estabelecidos pela ANVISA (5×10^3 UFC/g), e 21/50 (42%) apresentaram contagem de UFC/g dentro dos padrões estabelecidos. Já as amostras produzidas sob fiscalização 50/50 (100%) apresentaram valores abaixo de 5×10^3 UFC/g sendo, portanto, consideradas próprias para consumo (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal artesanais apresentando contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos valores aceitáveis para consumo. São Paulo, 2015.

<i>Staphylococcus</i> coagulase +		
Total de amostras	50	100%
Aceitáveis	21	42%
Não aceitáveis	29	58%

Tabela 6: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal fiscalizadas apresentando contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos valores aceitáveis para consumo. São Paulo, 2015.

<i>Staphylococcus</i> coagulase +		
Total de amostras	50	100%
Aceitáveis	50	100%
Não aceitáveis	0	0%

4.3. Contagem dos NMP de coliformes fecais totais e termotolerantes

Na contagem dos números mais prováveis de coliformes totais e termotolerantes, constatou-se que nas 50 amostras de linguiças suínas artesanais analisadas, 38/50 (76%) apresentaram contagens acima dos valores permitidos pela legislação vigente (5×10^3) sendo consideradas não aceitáveis para consumo, enquanto que apenas 12/50 (24%) apresentaram valores dentro dos limites aceitáveis.

Os resultados das 50 amostras de linguiças produzidas sob fiscalização, 38/50 (76%) apresentaram resultados aceitáveis e de 12/50 (24%) resultados acima dos valores limites aceitáveis para consumo (5×10^3) (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal artesanais apresentando contagem de NMP de coliformes fecais totais e termotolerantes acima dos valores aceitáveis para consumo. São Paulo, 2015.

NMP Coliformes fecais totais e termotolerantes		
Total de amostras	50	100%
Aceitáveis	12	24%
Não aceitáveis	38	76%

Tabela 8: Porcentagem de amostras de linguiça suína frescal fiscalizadas apresentando contagem de NMP de coliformes fecais totais e termotolerantes acima dos valores aceitáveis para consumo. São Paulo, 2015.

NMP Coliformes fecais totais e termotolerantes		
Total de amostras	50	100%
Aceitáveis	38	76%
Não aceitáveis	12	24%

4.4. Detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE*, *astA* nos isolados de *Escherichia coli* pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

Do total das 100 amostras de linguiças analisadas, isolaram-se cepas de *E. coli* em 39/100 (39%), sendo 24/50 (48%) cepas isoladas das amostras artesanais e 15/50 (30%) isoladas das amostras fiscalizadas. Detectou-se 1/15 (6,6%) cepa de *E. coli* enteropatogênica pertencente ao sorogrupo EPEC em uma das amostras de linguiça fiscalizada. Não foram detectadas cepas de *E. coli* patogênicas nas amostras de linguiças artesanais analisadas (Tabela 9) e (Figuras 13 e 14).

Tabela 9: Resultados das amostras positivas para o isolamento de *E. coli* e detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* e *astA*. São Paulo, 2015.

Total de Amostras	Cultivo positivo <i>E. coli</i>	Amostras	Gene <i>stx1</i>	Gene <i>stx2</i>	Gene <i>eae</i>	Gene <i>bfpA</i>	Gene <i>aggR</i>	Gene <i>elt</i>	Gene <i>esth</i>	Gene <i>estp</i>	Gene <i>invE</i>	Gene <i>ast A</i>	
50 Fiscalizadas	15 amostras	F5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F23	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F27	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F33	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F37	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F38	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F39	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F43	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F44	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F45	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F46	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
		F47	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
		F48	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		F49	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
		F50	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
50 Artesanais	24 amostras	A1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
		A2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
		A8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
		A11	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		A13	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		A15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		A16	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		A17	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		A19	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		A20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		A21	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		A22	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		A23	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
		A25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
		A27	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
A29	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos		
A30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos		
A31	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
A36	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
A41	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
A44	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	
A45	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
A47	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	
A48	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		

F: Fiscalizadas; **A:** Artesanais; **Neg:** Negativo; **Pos:** Positivo

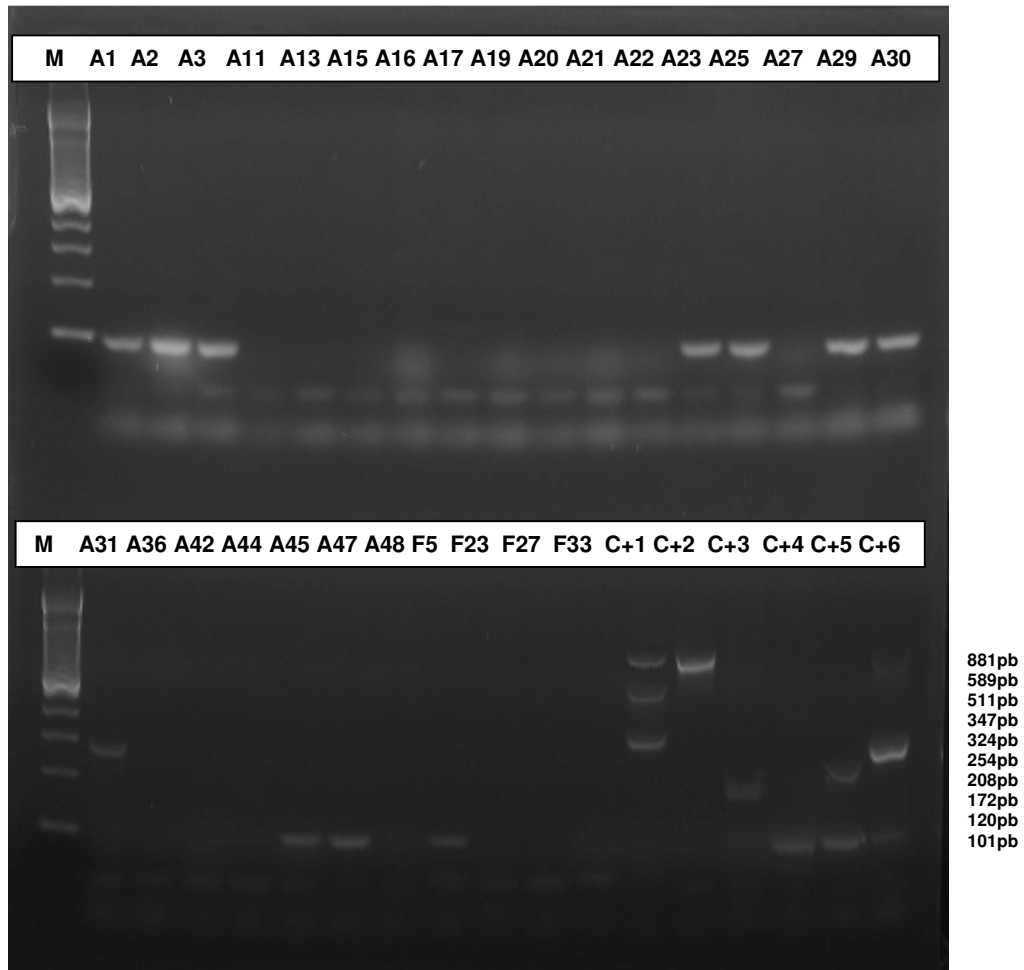


Figura 13: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* e *astA* das cepas de *Escherichia coli*. **M:** Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); **A:** Amostras artesanais; **F:** Amostras fiscalizadas; **C+1:** STEC; **C+2:** EPEC atípica; **C+3:** EIEC; **C+4:** ETEC; **C+5:** EAEC; **C+6:** EPEC; **pb:** pares de bases.

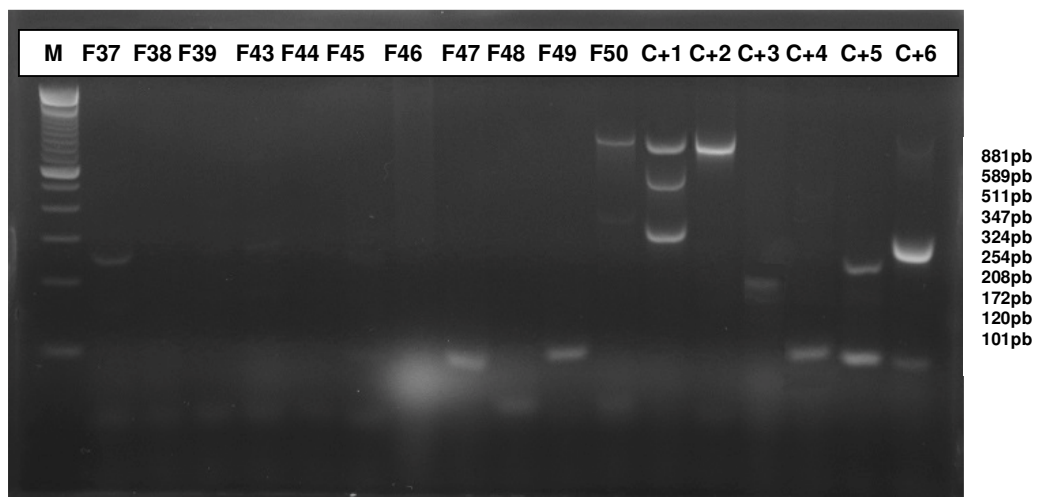


Figura 14: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* e *astA* das cepas de *Escherichia coli*. **M:** Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen); **A:** Amostras artesanais; **F:** Amostras fiscalizadas; **C+1:** STEC; **C+2:** EPEC atípica; **C+3:** EIEC; **C+4:** ETEC; **C+5:** EAEC; **C+6:** EPEC; **pb:** pares de bases.

4.5. Detecção de *Campylobacter* spp. pela técnica de cultivo e *C. jejuni* e *C. coli* pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Com relação à técnica de isolamento e PCR empregadas não foi observada a presença de *Campylobacter* spp. em nenhuma das 100 amostras, ou seja, constatou-se *Campylobacter* spp. em 0/100 (0%) das amostras analisadas (Figura 15).

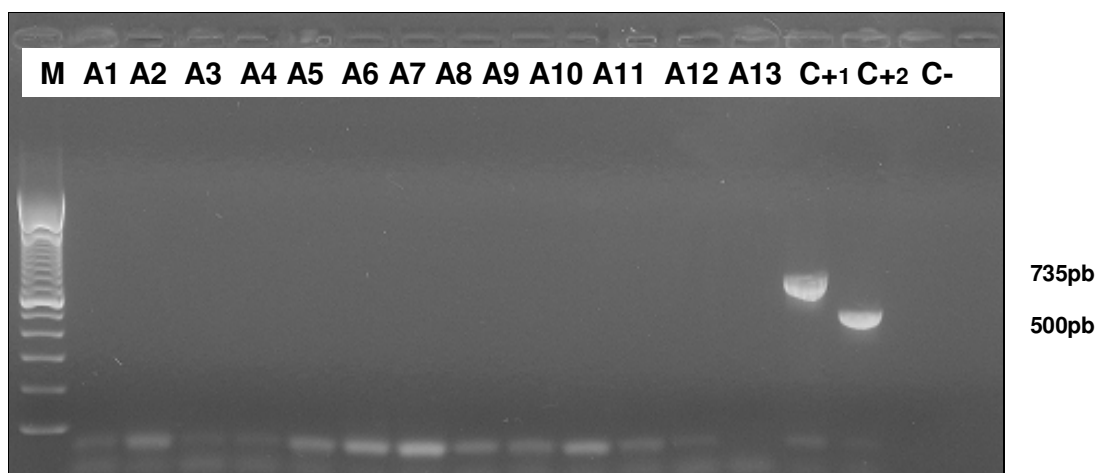


Figura 15: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. **M:** Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen); **A:** Amostras artesanais; **C+1:** Controle positivo de *C. jejuni*; **C+2:** Controle positivo de *C. coli*; **C-:** Controle negativo; **pb:** pares de bases.

4.6. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Os resultados obtidos da extração de DNA e PCR para *Listeria monocytogenes* também foi de 0/100 (0%) das amostras analisadas (Figura 16).

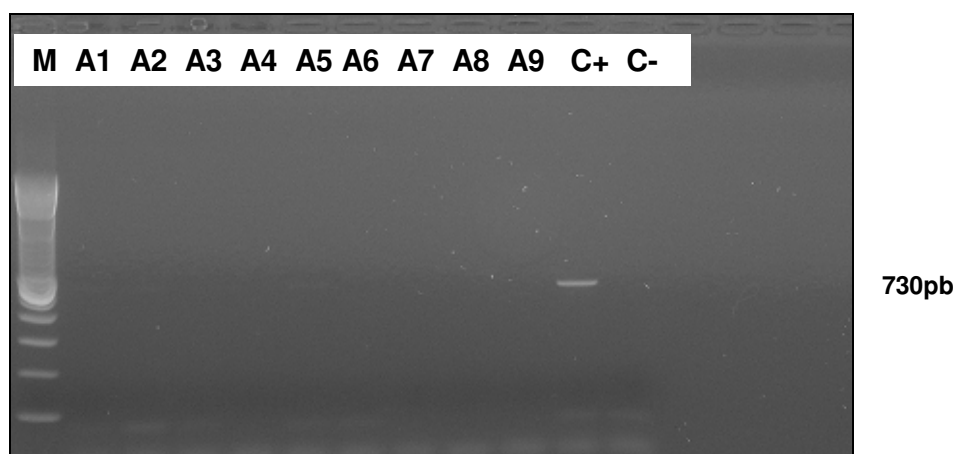


Figura 16: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Listeria monocytogenes*. **M:** Marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder* – Invitrogen); **A:** Amostras artesanais; **C+:** Controle positivo de *Listeria monocytogenes*; **C-:** Controle negativo; **pb:** pares de bases.

4.7. Análise microbiológica das águas de processamento das linguiças produzidas sob fiscalização

As oito amostras das águas de processamento utilizadas na produção das linguiças produzidas sob fiscalização apresentaram resultados negativos para presença de coliformes fecais, *Staphylococcus* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. Porém durante as análises constatou-se a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em uma das amostras. Verificou-se a presença desse microrganismo em ágar MacConckey utilizado no protocolo para pesquisa de *Salmonella* spp. O gênero e espécie foram identificados por meio de coloração de Gram e provas bioquímicas como catalase, oxidase, TSI, citrato, lisina, hidrólise de gelatina, redução de nitrato a nitrito, manitol e uréia.

4.8. Análise estatística

4.8.1. *Salmonella* spp.

Proporção de amostras impróprias entre as amostras fiscalizadas: 3/50 (6%).
Proporção de amostras impróprias entre as amostras artesanais: 6/50 (12%). Valor de P: = 0,487.

Interpretação: não houve diferença significativa nas proporções de amostras positivas fiscalizadas e artesanais.

4.8.2. *Staphylococcus coagulase positiva*

Proporção de amostras impróprias entre as amostras fiscalizadas: 0/50 (0%).
Proporção de amostras impróprias entre as amostras artesanais: 29/50 (58%). Valor de P: < 0,0001.

Interpretação: houve diferença significativa nas proporções de amostras impróprias fiscalizadas e artesanais.

4.8.3. Coliformes fecais totais e termotolerantes

Proporção de amostras impróprias entre as amostras fiscalizadas: 12/50 (24%).
Proporção de amostras impróprias entre as amostras artesanais: 38/50 (76%). Valor de P: < 0,0001.

Interpretação: houve diferença significativa nas proporções de amostras impróprias fiscalizadas e artesanais.

5. DISCUSSÃO

Durante os últimos anos tem sido registrado grande aumento no número de pessoas acometidas por toxinfecções alimentares, levando ao desenvolvimento de novas estratégias para prevenir e controlar os microrganismos envolvidos. Nesse contexto, as análises microbiológicas ainda constituem uma importante ferramenta no controle da contaminação dos alimentos (ANDERSEN et al., 2007). Na Dinamarca, a prevalência de microrganismos patogênicos transmitidos por alimentos tem sido monitorada e programas de controle e vigilância têm sido implementados sempre que elevados índices de isolamento sejam detectados (HALD et al., 2004)

Nos últimos anos, o número de surtos causados por *Salmonella* spp. tem aumentado consideravelmente em todo mundo, tanto em países em desenvolvimento como nos países desenvolvidos. Atualmente a *Salmonella* spp. é o agente etiológico mais comumente envolvido em casos e surtos de enfermidades transmitidas por alimentos em inúmeros países, inclusive no Brasil. (GEIMBA, et al., 2004; GERNER-SMIDT; WHICHARD, 2007; BRASIL, 2008; GREIG; RAVEL, 2009)

No presente estudo, a frequência de *Salmonella* spp. observada foi de 6/50 (12%) em amostras artesanais e 3/50 (6%) nas amostras produzidas sob fiscalização, valores que apesar de baixos podem ser considerados preocupantes visto que essa bactéria entérica é responsável por quadros graves de septicemia e infecções alimentares. No Brasil, segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, foram confirmados 42,9% de casos de infecções por *Salmonella* spp. No Rio Grande do Sul, foram evidenciados vários surtos epidemiológicos entre os anos de 1987 e 1998, onde este microrganismo foi responsável por 32% dos casos (Rio Grande do Sul, 1998).

Silva et al. (2002), ao analisar linguiças mistas tipo frescal em Pelotas, RS, verificaram que cinco (17,86%) das 32 amostras estavam contaminadas com *Salmonella* spp. Analisando linguiça mista tipo frescal, Sabione et al. (1999), verificaram a ocorrência de *Salmonella* spp em 17,9% das amostras obtidas em Ouro Preto (MG). Porém, em Lavras (MG) não foi isolada *Salmonella* spp. em nenhuma das 20 amostras de linguiças analisadas por Marques et al. (2001).

Diversas podem ser as fontes de introdução deste agente na cadeia alimentar, como condições inadequadas de abate e evisceração, nas quais as carcaças podem ser contaminadas por enterobactérias presentes no trato gastrointestinal (BORCH et al., 1996; TUTENEL et al., 2003).

Os resultados obtidos neste estudo com relação às amostras produzidas sob fiscalização, vão de encontro aos padrões estabelecidos pela legislação, a qual preconiza a ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de alimento (BRASIL, 2001), evidenciando que mesmo com a rigorosa vigilância ainda ocorrem falhas durante a elaboração do produto, visto que este requer inúmeras etapas de manipulação podendo haver contaminação em alguma das etapas de seu processamento, tornando-se um risco a saúde do consumidor, uma vez que este microrganismo possui alto grau de patogenicidade. É importante ressaltar que todos os sorotipos desse gênero são patogênicos ao homem, apresentando apenas diferenças de sintomatologia em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade (GERMANO, 1993).

Em um estudo realizado por Castagna (2004) avaliou-se a associação entre a presença de *Salmonella* spp. no trato gastrointestinal, linfonodos mesentéricos e tonsilas de suínos ao abate. Os maiores índices de isolamento de *Salmonella* foram obtidos a partir de linfonodos mesentéricos (61%), seguido do conteúdo intestinal (55,5%) e tonsilas (36,7%). A alta prevalência de suínos portadores de *Salmonella* spp. confirma os resultados encontrados previamente no mesmo abatedouro por Bessa et al. (2001), reforçando relatos anteriores sobre a persistência da infecção por *Salmonella* nos sistemas de produção (Blaha, 2001). Suínos portadores assintomáticos de *Salmonella* spp. no trato intestinal e linfonodos mesentéricos podem ser importante fonte de contaminação cruzada na linha de abate (Di Guardo et al., 1992).

Apesar da importância do conteúdo intestinal e dos linfonodos mesentéricos na identificação de animais portadores, esses tecidos são retirados da carcaça durante o processamento, não sendo produtos de consumo humano. Dessa forma, apesar do índice de isolamento encontrado em tonsilas ter sido inferior aos encontrados para conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos, estes representam maior risco ao consumidor, pois juntamente com músculos da região da cabeça, são utilizados na fabricação de embutidos e carne mecanicamente separada. Esses produtos, caso não sofram tratamento térmico na indústria, podem chegar contaminados ao consumidor, representando considerável risco para a ocorrência de infecção alimentar (CASTAGNA et al., 2004)

Alguns estudos têm apontado suínos positivos em linfonodos mesentéricos como sendo portadores assintomáticos de infecção prévia, ocorrida na granja. Estes animais, principalmente pelo estresse durante o transporte até o abatedouro, poderiam excretar *Salmonella* spp. nas fezes, contaminando outros suínos, que passariam a ser

positivos no conteúdo intestinal e nas tonsilas, tornando-se disseminadores passivos (MORROW et al., 2000).

O risco potencial desses animais durante o processamento foi demonstrado por Swanenburg et al. (2001a), que encontraram correlação significativa entre presença de *Salmonella* spp. em tonsilas e conteúdo intestinal com carcaças positivas na linha de abate. Outros estudos (SWANENBURG et al., 2001; ROSTAGNO et al., 2002) comprovaram a influência do tempo de permanência em currais pré-abate com alto nível de contaminação residual por *Salmonella* spp. sobre o número de suínos positivos ao abate.

Hurd et al. (2001) verificaram que, sob condições experimentais, a *Salmonella* spp. pode infectar suínos expostos a ambientes contaminados após duas horas de contato.

Assim como no presente estudo, onde a maioria dos isolados de *Salmonella* foram identificadas como pertencente ao sorovar Typhimurium, os mesmos achados tem sido relatados por outros autores como Costa (2010) onde foi observada uma positividade total de *Salmonella* spp em 14,5%, com predominância dos sorovares *S. Typhimurium* (45%) e *S. Derby* (20%). Resultados semelhantes foram encontrados por Spricigo et al. (2008), em amostras de linguiça tipo frescal, coletadas no comércio de Lages, em Santa Catarina, sendo que *Salmonella* spp. foi detectada em 12,8% das amostras, também com prevalência do sorovar *S. Typhimurium*.

Mundialmente verifica-se que a positividade para *Salmonella* spp. em produtos cárneos varia consideravelmente de acordo com o país e produto cárneo considerado. Na Irlanda, por exemplo, a positividade em linguiças suínas relatada por Boughton et al. (2004) foi baixa (1,7%), enquanto no México foi relatada uma positividade de 88,3% (ESCARTIN et al., 1999)

Embora se saiba que a *Salmonella* spp. presente nas amostras analisadas poderá ser inativada pelo processamento térmico do alimento, pode haver risco de contaminação cruzada de outros alimentos em contato com a mesma superfície onde a linguiça suína frescal foi previamente preparada, bem como a recontaminação desse alimento, após o tratamento térmico, condições estas que não podem ser descartadas.

Na verificação da ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva, observou-se neste estudo que 50/50 (100%) das amostras artesanais apresentaram contaminação por esse microrganismo, sendo que 29/50 (58%) delas estavam acima dos padrões permitidos pela legislação vigente que é de 5×10^3 UFC/g de alimento. Em contrapartida, 33/50 (66%) das amostras de linguiças fiscalizadas também se apresentaram contaminadas, porém, não houve nenhuma amostra com contagem

acima dos valores aceitáveis, ou seja, 0/50 (0%) não apresentaram contagem elevada a 5×10^3 UFC/g de alimento.

Considerando os dados encontrados em estudos relacionados com ECP em linguiça frescal suína, Amaral et al. (1984), El-Khateib (1997) e Chaves et al. (2000), relataram 12,5%, 29,3% e 40%, respectivamente, das amostras positivas. Analisando linguiça suína frescal em Pelotas-RS, Mata (2002) encontrou 72,5% de suas amostras contaminadas por *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo que 20% destas estavam acima do permitido pela legislação. Assim como Marques et al. (2001) em Lavras, MG analisando linguiça frescal encontraram 25% das amostras contaminadas por ECP acima dos limites permitidos na legislação. Enquanto que no estudo feito por Almeida Filho e Sigarini (2002) encontraram 60% das amostras contaminadas com *Staphylococcus aureus*, sendo que destas, todas se encontravam fora dos padrões exigidos na legislação.

Nos últimos anos, vários *Staphylococcus* que contaminam produtos alimentares, incluindo a carne vermelha, tem sido implicados em surtos de intoxicação alimentar (BENITO et al., 2000; MIWA et al., 2001).

O índice de ECP nas amostras analisadas é bastante significativo, uma vez que a presença deste microrganismo representa risco à saúde do consumidor, pois são potencialmente patogênicos, e suas toxinas são capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização, podendo causar intoxicação alimentar. Morot-Bizot et al. (2006) citam que as diversas espécies de *Staphylococcus* sp. encontradas em amostras de linguiça estão associadas às matérias primas e às condições da planta de produção, visto que *Staphylococcus* spp. podem colonizar superfícies de equipamentos mal higienizados.

Dentre os *Staphylococcus* coagulase positiva destaca-se o *Staphylococcus aureus* que em países da Europa, nos Estados Unidos e Canadá é o principal agente causador de doenças transmitidas por alimentos (VIESTEL et al., 2000).

No presente estudo não houve contagens acima dos padrões permitidos para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras produzidas sob fiscalização, porém as contagens *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos parâmetros máximos permitidos pela legislação têm sido encontradas em diversos trabalhos. Como exemplos têm-se as pesquisas desenvolvidas por Bromberg et al. (2000), Garcia et al. (2000) e por Marques et al. (2001), que avaliaram esse mesmo tipo de alimento comercializado em Campinas (SP), Londrina (PR) e Lavras (MG), respectivamente.

Como *Staphylococcus* spp. tem como habitat natural as vias aéreas superiores, mãos, cabelos e pele dos seres humanos, faz com que o manipulador torne-se uma

potencial fonte de contaminação. É provável que as amostras artesanais analisadas no presente estudo fossem produzidas por manipuladores sem utilização de luvas, máscaras ou gorros ocasionando assim a elevada contaminação por esse microrganismo.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, verificou-se a presença de coliformes fecais totais e termotolerantes em 100/100 (100%) das amostras analisadas, sendo que 38/50 (76%) das amostras de linguiças frescas artesanais e 12/50 (24%) das linguiças frescas industrializadas apresentaram contaminação por coliformes totais e termotolerantes acima dos valores vigentes na legislação (BRASIL, 2001). Os resultados mostram que mais da metade das amostras artesanais estão fora dos padrões aceitáveis para consumo, justificando a importância de se seguir instruções normatizadas de qualidade.

Do total das 100 amostras analisadas detectou-se a presença de *E. coli* em 39/100 (39%), resultados já esperados baseando-se nos valores dos NMP de coliformes obtidos anteriormente e visto que a linguiça frescal é um produto de origem animal, a *E. coli* é encontrada normalmente no trato gastrointestinal de animais de sangue quente, podendo permanecer nas carcaças durante o processamento e contaminar a carne utilizada como matéria prima para a produção dos embutidos frescos.

Na literatura se verificaram alguns trabalhos que também apresentaram índices bastante elevados tanto para presença de coliformes fecais totais como para presença de *E. coli*, como o realizado por Moreira (2001) que encontrou esse microrganismo em 100% das amostras de linguiças analisadas. Mata (2002) ao analisar 40 amostras de linguiça suína frescal comercializadas em feiras de Pelotas, RS observou que 85% das amostras ultrapassaram o valor permitido de contaminação por coliformes termotolerantes e 55% apresentaram contaminação por *E. coli*, resultados semelhantes aos resultados encontrados por Iglesias (2007) em que 50% das amostras apresentaram contaminação por esse microrganismo.

Durante a coleta das amostras foi possível verificar durante as visitas aos frigoríficos que todo processo do abate de suínos sob Fiscalização foi realizado de forma correta e a produção seguindo todas as normas de boas práticas de fabricação, porém não se sabe quais eram as condições higiênico-sanitárias do abate e matéria prima utilizadas para a produção das linguiças suínas frescas artesanais. Baseando-se nos resultados do presente trabalho infere-se que as condições de higiene para fabricação desses produtos artesanais eram precárias visto que mais da metade das amostras analisadas apresentam valores extremamente elevados de Coliformes fecais e termotolerantes.

De modo geral, sejam os valores aceitáveis ou não, em 100% das amostras verificou-se a presença de coliformes fecais, cuja contaminação pode ter ocorrido durante o processamento do produto, principalmente na obtenção da matéria prima, ou durante o abate e evisceração. É possível também considerar como uma das fontes de contaminação o invólucro da linguiça frescal, pois muitas vezes as próprias vísceras dos animais são utilizadas para esse fim, o que aumenta a probabilidade da presença de Enterobactérias.

Carvalho, Oliveira e Franco (1985) ao verificarem a ocorrência de coliformes totais e fecais termotolerantes em embutido frescal, encontraram 89% das amostras positivas para este grupo de microrganismo, sendo destas 77% confirmadas para *E.coli*. Analisando carne suína, Calderon e Furlaneto (1990) encontraram 23,3% das amostras contaminadas por coliformes fecais e *E. coli* acima do máximo permitido pelos padrões adotados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Chaves et al. (2000) detectaram que 33,33% das amostras de linguiças comercializadas no Rio de Janeiro estavam em desacordo com a legislação. Marques et al. (2001) verificaram que 35% das amostras de linguiça frescal adquiridas em Lavras e Três Corações, MG encontravam-se fora do padrão legal vigente para Coliformes termotolerantes.

Moreira (2001) pesquisou *E. coli* em toda a linha de processamento de linguiça mista, em indústria da cidade de Araraquara (SP) e encontrou o microrganismo em todos os pontos amostrados, que incluíam a matéria-prima, superfícies de equipamentos e utensílios, mãos de manipuladores, condimentos e produto final. Através desses resultados pode-se supor que a contaminação por *E. coli* no produto final foi decorrente tanto das etapas de produção da linguiça frescal quanto da má higienização de seus manipuladores, podendo ocorrer em qualquer um desses pontos, o que justifica o índice elevado de contaminação por este microrganismo encontrado no presente estudo, principalmente das amostras artesanais.

Estudos realizados no Brasil, Estados Unidos e Inglaterra, demonstram que, segundo Bettelheim (2005) em geral a *E.coli* presente em carnes é proveniente das fezes e conteúdo intestinal de animais e ao sobreviver ao abate e ao processamento, seja a provável fonte de disseminação desse microrganismo na população animal e nos produtos de origem animal. Este fato evidencia a grande probabilidade de contaminação dos derivados cárneos, como a linguiça frescal, devido a suas várias etapas de manipulação, sendo um fator de alto risco ao consumidor visto que indica contaminação fecal recente.

A contagem de coliformes totais mostrou que todas as amostras apresentaram-se positivas, porém a legislação não prevê contagem de coliformes totais nos

alimentos, pois a presença deste grupo de microrganismo não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de patógenos. Os mesmos resultados foram encontrados em estudos realizados por Mendonça e Granada (1999) e Ritter et al. (2001) que analisando produtos cárneos, encontraram 100% das suas amostras contaminadas com coliformes totais.

Já Bezerra et al. (2007) analisando o mesmo produto, observaram que 27% das amostras comercializadas no município de Soletânea, PB, apresentaram elevados valores de Coliformes totais.

O alto índice de contaminação por coliformes totais e termotolerantes nas linguiças tipo frescal analisadas neste estudo pode ser decorrente da falta de higiene de seus manipuladores, bem como da precariedade no processamento e armazenagem do produto, principalmente das linguiças fabricadas artesanalmente que apresentaram o dobro de amostras fora do padrão quando comparadas às linguiças do mesmo tipo fabricadas sob inspeção, o que evidencia a necessidade de sensibilizar os comerciantes e os consumidores da importância do serviço de inspeção permanente.

Outro resultado encontrado no presente trabalho foi a detecção de 1 cepa de *E. coli* positiva para os genes *eae* e *bfpA*, pertencente ao patótipo EPEC (*E. coli* enteropatogênica) em uma das amostras de linguiças produzidas sob fiscalização.

Kobayashi et al. (2000), Clarke (2001) relatam que o subgrupo de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) são linhagens de *E. coli* diarreiogênicas historicamente associadas a surtos de diarreia infantil principalmente em países subdesenvolvidos.

Atualmente, em países desenvolvidos, EPEC é isolada em surtos esporádicos com frequência muito baixa em casos de diarreia endêmica. Entretanto, em países em desenvolvimento, principalmente nos localizados em zona tropical EPEC está entre os principais agentes enteropatogênicos, especialmente, na diarreia dos lactentes, com altos índices de mortalidade. No Brasil, EPEC é responsável por cerca de 30% dos casos de diarreia aguda em crianças de baixa renda com idade inferior a seis meses (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Segundo Nataro & Kaper (1998) esse patógeno atinge principalmente crianças menores de dois anos de idade e os sintomas são bastante severos. As crianças infectadas apresentam diarreia aquosa persistente, febre e vômitos. Para Trabulsi et al. (2002), EPEC pertence a um limitado número de sorotipos, sendo que cerca de 80% das amostras isoladas das fezes de crianças pertencem aos sorotipos O55:H6, O86:H34, O111:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6 e O142:H34. A maioria desses sorotipos corresponde a clones geneticamente próximos quando estudados por métodos moleculares.

De acordo com Nataro & Kaper (1998), a EPEC tem como principal reservatório o homem, raramente são encontradas em animais, e quando presentes, os sorotipos identificados não correspondem aqueles de humanos. Kuhnert et al. (2000) relatam que usualmente a bactéria é transmitida pela água, alimentos contaminados e colonizam o intestino delgado. Viljanen et al. (1990) afirmam que embora as infecções por EPEC sejam predominantes em crianças, a bactéria também pode causar diarreia em adultos quando houver ingestão de grande quantidade do inóculo, cerca de 10^8 a 10^{10} UFC.

Existem, relativamente poucas informações sobre alimentos associados com infecções por EPEC (Varnam & Evans, 1996). Pesquisas desenvolvidas no Brasil procuram mostrar a importância dos coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* como indicadores higiênico-sanitários na obtenção, nas fases tecnológicas, no processamento e/ou na comercialização de produtos cárneos e dos possíveis riscos que podem acometer aos consumidores, porém, não foram encontrados relatos sobre a pesquisa dos fatores de patogenicidade dessas bactérias em amostras de embutidos suínos frescal no Brasil, o que torna este estudo inédito.

Com relação aos outros sorogrupos de *E. coli*, trabalhos realizados em outros países relataram a ocorrência de STEC em produtos cárneos de aves e de suínos (MAINIL; DAUBE, 2005). Lee et al. (2009) detectaram cepas de STEC em 7,3% de amostras de carne de frango e em 2% de carne suína adquiridas no comércio varejista da Coreia. Mayrhofer et al. (2004), analisando amostras de produtos cárneos adquiridos no comércio varejista da Áustria, observaram que as prevalências de STEC em carnes bovina e suína foram de 5,2% e 1,7%, respectivamente. Na Suíça, Fantelli; Stephan (2001), analisando 400 amostras de carne moída bovina e suína coletadas em açougues, detectaram STEC em 1,7% das amostras e isolaram cinco sorotipos diferentes, nenhum deles pertencentes ao sorotipo O157:H7.

Desde o primeiro relato de surto por *E. coli* O157:H7 ocorrido em 1981 (RILEY et al., 1983), os meios de cultura para pré-enriquecimento e isolamento dessas cepas patogênicas vêm sendo constantemente modificados visando melhorar sua eficiência já que, quando presentes em alimentos, esses microrganismos estão em quantidades muito reduzidas. Além disso, uma das maiores dificuldades no isolamento dessas cepas patogênicas, principalmente a STEC é o uso de um método capaz de detectar baixas concentrações, uma vez que essas cepas, quando presentes nos alimentos, estão em pequena quantidade (HUSSEIN; BOLLINGER, 2008).

No presente estudo não foi detectado a presença de *Campylobacter* spp. em nenhuma das amostras analisadas tanto pela técnica de cultivo microbiológico quanto pela técnica de PCR. Na literatura são poucos os trabalhos que apresentam amostras

positivas para esse microrganismo em linguiças suínas, como Medeiros et al. (2008) e Bohaychuk et al. (2006), no Canadá que também não detectaram o patógeno em carne suína, assim como Cortez et al. (2004) que analisou amostras de linguiça suína fresca produzidas sob fiscalização e produzidas artesanalmente na região de Jaboticabal. No trabalho de Ristori (2010) pesquisou-se *Campylobacter* spp. em diversos produtos cárneos como salsicha bovina, linguiça suína, carne bovina moída e coxa de frango, e nenhuma das amostras das linguiças analisadas foram positivas para esse patógeno.

Os poucos trabalhos encontrados onde se detectou esse patógeno em produtos cárneos de origem suína foram Pezzoti et al. (2003) na Itália apresentando 10,3% de positividade, 9,1% na Nova Zelândia (WONG et al. 2007), 6,3% nos Estados Unidos (LITTLE et al., 2008) e 2,5% na Bélgica (GHAFIR et al., 2007). É comum encontrar trabalhos sobre a presença de *Campylobacter* spp. em frangos e seus derivados, porém, no Brasil, não foram encontrados outros estudos sobre a ocorrência de *Campylobacter* spp. em linguiça suína e até mesmo em carne bovina. Durante as etapas de processamento de produtos cárneos, o tratamento térmico, resfriamento e o congelamento podem causar redução do número de *Campylobacter* spp. nas amostras ou até mesmo sua eliminação (GHAFIR et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008), o que pode explicar a ausência deste patógeno nas amostras de linguiças estudadas. O *Campylobacter* spp. também é sensível as concentrações de cloreto de sódio superiores a 1,5% (HOLT et al., 1994) e esse alimento além do sal tem outros condimentos que também podem ter minimizado a contaminação desse alimento por esse patógeno. Devido ao fato de *C. jejuni* não se multiplicar abaixo de 30°C e ser sensível às concentrações normais de oxigênio da atmosfera, somente poucas células podem estar presentes nos alimentos, geralmente inferiores a $1,0 \times 10^2$ células/g (FLORENTINO et al., 1997). Pode ainda haver competição com a microbiota autóctone, segundo Franco (1995) e como citam também Varnam & Evans (1991) a sobrevivência do *Campylobacter* spp. é reduzida pela presença de outros microrganismos, que levam à diminuição do valor do pH e à produção de ácidos orgânicos.

De acordo com os dados encontrados nesse estudo e os reportados na maioria dos outros estudos, aparentemente o *Campylobacter* spp. não é um patógeno de significância em produtos cárneos de origem suína, porém antes de se comprovar essa informação, deve-se ressaltar que no Brasil há poucos dados a respeito desse microrganismo nesse tipo de produto, dificultando a avaliação do impacto da sua presença em alimentos de origem suína para a saúde pública (SILVA et al., 2012).

Não foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes* por meio da técnica de PCR em nenhuma das amostras analisadas no presente estudo, fato incomum visto que muitos trabalhos apresentam positividade para detecção desse microrganismo e muitas vezes em altas porcentagens como descrito por Ristori (2010), que detectou a bactéria em 39,8% das amostras analisadas, resultado semelhante foi observado por Miyasaki et al. (2009) que detectaram o patógeno em 42% das amostras coletadas em supermercados do Município de São Paulo. Ocorrência maior foi observada por Destro, et al. (1991), que relataram a presença de *Listeria* em 70% das amostras analisadas.

Estudo realizado por Silva et al. (2004) em três frigoríficos de Pelotas, Rio Grande do Sul, indicou que a ocorrência de *L. monocytogenes* nas matérias-primas utilizadas para a fabricação de linguiça (29,4%) foi mais alta do que a observada no produto final (16,7%). Os autores inferiram que durante o processamento da linguiça, os efeitos conjugados de cloreto de sódio, sais de cura (nitrito) e pH baixo poderiam ter controlado a multiplicação do microrganismo ou ocasionado estresse nas células bacterianas, dificultando o isolamento pelas metodologias convencionais. Entretanto, no presente trabalho utilizou-se a técnica de PCR para detecção do agente e mesmo que não houvesse células vivas viáveis, seria possível detectar a presença da *Listeria* nas amostras por meio da amplificação do DNA, portanto, as 100 amostras analisadas não apresentaram nenhum tipo de contaminação por esse patógeno.

Em contrapartida ao estudo de Silva et al. (2004) citado anteriormente, outro estudo realizado em uma planta processadora de linguiça no Rio Grande do Sul indicou a ocorrência de *L. monocytogenes* em todas as amostras de linguiças analisadas, mas nenhuma das amostras de matéria-prima continha o microrganismo, indicando que a contaminação ocorreu durante o processamento (VON LAER et al, 2005).

A ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos crus no comércio, geralmente é mais alta do que a observada nas etapas iniciais de processamento, indicando que a contaminação pode ocorrer e também aumentar durante o processamento (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004). Segundo Thevenot et al. (2006) as etapas de resfriamento e de corte das carnes suínas podem ser responsáveis pelo aumento da prevalência de *L. monocytogenes* no produto final. A metodologia utilizada no presente estudo pode justificar a ausência da *Listeria* spp. em 100% das amostras analisadas, pois de acordo com o estudo realizado por Ristori (2010) o método analítico utilizado para verificar se um alimento contém *L. monocytogenes* tem um papel importante na positividade encontrada, pois a utilização de duas metodologias, simultaneamente, com emprego de dois meios seletivos, permitiu uma melhor

avaliação da contaminação por esse patógeno, técnicas essas não utilizadas no presente trabalho, visto que não foi empregado nenhum meio seletivo de enriquecimento prévio antes da realização da extração de DNA. Outro fator que pode ter influenciado nos resultados deste trabalho foi o fato de ter sido utilizado somente primers específicos para *L. monocytogenes*, sendo que alguns trabalhos citam a *L. innocua*, a espécie mais frequentemente detectada (RISTORI, 2010). Esses dados corroboram a maioria dos resultados descritos na literatura, nacional e internacional, que indicam que *L. innocua* é a espécie mais comum em alimentos (BARBALHO et al., 2005; CHEN et al., 2009; CHIARINI et al., 2009; DESTRO et al., 2001; SILVA et al., 2004; VON LAER et al., 2005; YÜCEL et al., 2005), porém a *L. Innocua* não é uma espécie patogênica.

Nas águas utilizadas no processamento das linguiças suínas frescas produzidas sob fiscalização, apenas uma amostra estava contaminada com o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*.

O isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras de água colhidas nos estabelecimentos que comercializam carne e produtos cárneos tem grande importância, uma vez que este microrganismo produz enzimas termodúricas, responsáveis pela deterioração dos alimentos, diminuindo seu prazo de vida comercial (Madeira et al., 1997). Além da deterioração dos alimentos, a presença deste microrganismo na água é importante, pois além de ser deteriorante e indicadora de contaminação, é também um patógeno oportunista que frequentemente está envolvido com infecções que variam em local e severidade: desde infecções superficiais como foliculites e piodermites a pneumonia em pacientes com pneumopatia crônica expostos a aerossóis contendo água contaminada (Rosenberg, 1999).

Em um trabalho realizado por Amaral et al. (2007) verificou-se a qualidade da água utilizada em estabelecimentos que comercializavam produtos cárneos na região de Jaboticabal, cujas análises foram realizadas em 2 períodos, chuvas e estiagem, coletados tanto amostras de água na entrada do estabelecimento como após a passagem pelo reservatório. Em seus resultados também se verificou a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em 7,5% das amostras no período de chuva, 5,3% no período de estiagem e 15% após a passagem pelo reservatório no período de chuva. Esse mesmo autor isolou também *Staphylococcus aureus* em 15% das amostras no período de chuva, 13,1% no período de estiagem, 20% no período de chuva após passagem da água pelo reservatório e 18,4% no período de estiagem após a passagem pelo reservatório.

Como citado anteriormente no presente estudo, não foi isolado *Staphylococcus* spp. e nenhum outro microrganismo pesquisado, concluindo-se portanto que a água não foi a fonte de contaminação dos produtos produzidos sob fiscalização.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste estudo, é possível concluir que:

Isolou-se *Salmonella* spp. dos dois tipos de amostras (artesaniais e fiscalizadas), sendo o sorotipo *S. Tiphymurium* mais frequentemente detectado em ambos os tipos de amostras.

Dentre os patógenos estudados, os coliformes fecais foram os mais frequentemente encontrados, estando presentes em todas as amostras analisadas, sendo que mais da metade das amostras artesaniais, apresentavam valores acima dos limites aceitáveis pela legislação vigente.

O segundo patógeno mais frequentemente isolado foi o *Staphylococcus* coagulase positiva, porém somente as amostras artesaniais apresentaram limites de contagem acima dos valores aceitáveis.

Detectou-se 1 cepa de *Escherichia coli* patogênica pertencente ao grupo EPEC em uma amostra de linguiça fiscalizada.

Nenhuma das amostras analisadas apresentou contaminação por *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytogenes*.

Não foi identificado nenhum dos microrganismos pesquisados nas águas de processamento das linguiças fiscalizadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEPCS, 2013. **Consumo Mundial de Carne Suína**. Disponível em: <http://www.abiepcs.org.br/pt/estatisticas/mundial/consumo-2.html>. Acesso em: 16 jul. 2014a.
- ABIEPCS, 2013. **Importação Mundial de Carne Suína**. Disponível em: <http://www.abiepcs.org.br/pt/estatisticas/mundial/importacao.html>. Acesso em: 16 jul. 2014b.
- ABIEPCS, 2013. **Exportação Mundial de Carne Suína**. Disponível em: <http://www.abiepcs.org.br/pt/estatisticas/mundial/exportacao.html>. Acesso em: 16 jul. 2014c.
- AKIBA, M.; KUSUMOTO, M.; IWATA, T. Rapid identification of *Salmonella* enterica serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. **Journal of Microbiological Methods**. v. 85. p. 9 – 15. 2011.
- ALBAN, L.; STÄRK, K.D.C. Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* presence in the slaughtered swine carcass effectively? **Preventive Veterinary Medicine**. Amsterdam, v.68, p.63-79, 2005.
- ALLOS, B.M. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, n.8, p.1201-1206, 2001.
- ALMEIDA FILHO; E. S.; SIGARINI, C. O. Características microbiológicas de linguiça fresca, produzida sob inspeção federal e sob condições artesanais, comercializada no município de Cuiabá-MT. **Higiene Alimentar**. 2002.
- ALTEKRUSE, S. F. *Campylobacter jejuni* in foods. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.213, p.1734-1735, 1998.
- ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.5, p.28-35, 1999
- ALZAND, B.S.; ILHAN, M.; HEESEN, W.F.; MEEDER, J.G. *Campylobacter jejuni*: enterocolitis and myopericarditis. **International Journal of Cardiology**, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168238?dopt=C%20itation> Acesso em: 12 abril 2013.
- AMARAL, L. A.; JUNIOR, O. D. R.; FILHO, A. N.; FERREIRA, F. L. A.; HAGI, D. D. Água utilizada em estabelecimentos que comercializam produtos cárneos, na cidade de Jaboticabal/SP, como via de contaminação dos alimentos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 1, p. 3-6, 2007.
- AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; LACAVAL, P. M. Colimetria e pesquisa de *Staphylococcus aureus* em linguiças de carne suína do tipo fresca, comercializadas em Jaboticabal, SP. **Higiene Alimentar**, v. 3, n 3/4, p. 211-214, 1984.

ANDERSEN, J. K. New strategies for the use of microbiological examinations in food control in Denmark. **Food Control**, v. 18, p. 273-277, 2007.

ANON E. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on *Listeria monocytogenes*. **Brussels, Belgium: European Commission. Health and Consumer Protection Directorate-General**, 1999.

ANVISA, **Segurança Alimentar na Cadeia do Leite**. XI Congresso Nacional de Laticínios, 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/aulas/congresso_laticinios.pdf. Acesso em: 15. Agosto 2014.

AQUINO, M.H.; PACHECO, A.P.; FERREIRA, M.C.; TIBANA, A. Frequency of isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* from animals in Brazil. **Veterinary Journal**, v.164, n.2, p.159-161, 2002.

AQUINO, M.H.C.; CARVALHO, J.; CARLOS, P.; TIBANA, A.; FRANCO, R.M. *Campylobacter jejuni/coli*: methodology of isolation and possible interfering factors in primary culture. **Journal of Food Protection**, v.59, p.429-432, 1996.

AUGUSTO FILHO, O. **Isolamento de *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos, comercializadas no município de Botucatu-SP**. Botucatu 62p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2001.

BAGGESEN, D. L.; WEGENER, H. C. Phage types of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar *Typhimurium* isolated from production animals and humans in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 35, n. 4, p. 349-354, 1994.

BALBANI, A. P. S. & BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, v.23, n.4, p. 320-328, 2001.

BARBALHO, T.C.F.; ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid conformation of suspect colonies. **Food Control**, v. 16, n. 3, p. 21-26, 2005.

BARRETO, S. M. & COSTA, M. F. L. Investigação de um surto de intoxicação alimentar em Belo Horizonte, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.14, n.2, p. 442-443, 1998.

BELKUM, A. et al. Clonal distribution and differential occurrence of the enterotoxin gene cluster, *egc*, in carriage- versus bacteremia associated isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1555-1557, 2006.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Listeria Zaragoza**: Acribia, p. 173, 1998.

BENITO Y, KOLB FA, ROMBY P, LINA G, ETIENNE J, VANDENESCH F. Probing the structure RNAIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. **RNA**, v.6, p: 668–679,2000.

BERCHIERI JUNIOR., A.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**. Huntingdon, v. 30, p. 221-231, 2010.

BERENDS, B. R.; VAN KNAPEN, F.; MOSSEL, D. A. A. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 219-229, 1998.

BERGAMINI, A.M.M.; SIMÕES, M.; IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.553-556, 2007.

BESSA, M.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul**. 144 F. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. **Prevalence of *Salmonella* sp. in slaughtered pigs in Rio Grande do Sul**. In: proceedings of international symposium on the epidemiology and control of *Salmonella* in pork. Anais Leipzig: University of Leipzig, p.189-191, 2001

BETTELHEIM, K.A. et al. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p. 699-709, 2005.

BEUCHAT, L.R. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. **Food Control**, Letchworth, v.7, n.4/5, p.223-228, 1996.

BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M.A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.11, p.2559-2564, 1989.

BEZERRA, W.I.; MARTINS, T.D.D.; BATISTA, E.S.; SANTOS, J.G.; ARRUDA, J.C.B.; MOREIRA, R.T.; SILVA, L.P.G. **Qualidade microbiológica de linguiça mista tipo frescal comercializada no município de Sletânea-PB, Brasil**. In: II Jornada Nacional da Agroindústria, Bananeiras, 2007.

BLAHA, T. **The impact of *Salmonella* on the swine industry**. In **Swine Conference**, Nebraska, p. 1-20, 1996.

BLAHA, T.H. **Pre-harvest food safety as integral part of quality assurance systems in the pork chain from “stable to table”**. In: proceedings of international symposium on the epidemiology and control of *Salmonella* in pork. Anais Leipzig: University of Leipzig, p.7-13, 2001.

BLAIS, B. W.; PHILIPPE, L. M. **Identification of presumptive positive *Listeria monocytogenes* from foods by polimerase chain reaction (PCR)**. HPB Laboratory Producere (MFLP-78). In: Laboratory Producere for the microbiological analisys of food.v.3: The compendium of analytical methods. Morin Heights. Quebec: Polyscience Publications, 1995.

BOHAYCHUK, V. M.; GENSLER, G. E.; KING, R. K.; MANNINEN, K. I.; SORENSEN, O.; WU, J. T.; STILES, M. E.; MCMULLEN, L.M. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in

Edmonton, Alberta, Canada. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 9, p. 2176-2182, 2006.

BORCH, E. NESBAKKEN, T.; CHRISTESEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to fooborne bacteria. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, p. 9-25, 1996.

BORGES, K.A. **Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Salmonella* Enteritidis através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase**. 171 F. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BOROWSKY, L.M.; BESSA, M.C.; CARDOSO, M.I.; AVANCINI, C.A.M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.36, 2006.

BOUGHTON, C.; LEONARD, F. C.; EGAN, J.; KELLY, G. MAHONY, P. O.; MARKEY, B.K; GRIFFIN, M. Prevalence and number of Salmonella in Irish retail pork sausages. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1834-1839, 2004.

BRASIL, 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Suínos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>. Acesso em: 16 jul. 2014a

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Veterinária. **Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm Acesso em: 15 Jul. 2012.

BRASIL. MAPA , Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo I – Capítulo XV** . Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078> Acesso em: 14 Agosto. 2012a.

BRASIL. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo III – Capítulo 2** . Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=2400> Acesso em: 13 Set. 2012c.

BRASIL. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo I – Capítulo V** . Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078> Acesso em: 14 Agosto 2012d.

BRASIL, 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter*: gênero *Campylobacter*: diagnóstico laboratorial clássico e molecular**. 40p. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/09/manual-tecnico-diagnostico-laboratorial-campylobacter.pdf> Acesso em 14 Agosto 2012e.

BROMBERG, R.; YAMADA, E.A.; MIYAGUSKU, L. **Estudos da qualidade microbiológica de carnes e produtos cárneos crus resfriados**. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17. Resumos Fortaleza: SBCTA, Universidade Federal do Ceará, v.1, p.122, 2000.

BÜRK, C.; DIETRICH, R.; ACAR, G.; MORAVEK, M.; BÜLTE, M. MÄTLBAUER, E. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.5, p.2106-2112, 2003.

BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.10, p.868-876, 2004.

CADONA, J. S.; BUSTAMANTE, A. V.; PARMA, A. E.; LUCCHESI, P. M. A.; SANZO, A. M. Distribution of additional virulence factors related to adhesion and toxicity in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw products in Argentina. **Applied Microbiology**, Washington, v.56, n.1 p.449-455, 2013.

CALDERON, D. F.; FURLANETO, S. M. P. Análise bacteriológica de carne suínas comercializadas em açougues da cidade de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.21, n.4, p. 331-336, 1990.

CALIL, R. M.; SCARCELLI, E.; MODELLI, K. D.; CALIL, E. M. B. **Campilobacteriose: o agente, a doença e a transmissão por alimentos**. São Paulo: R.M. Calil, 129 p., 2008.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v.36, n.3, p.289-311, 2005.

CARMO, G. M. I., OLIVEIRA, A. A., DIMECH, C. P., SANTOS, D. A., ALMEIDA, M. G., BERTO, L. H., ALVES, R. M. S. & CARMO, E. H. 2005. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004**. Boletim Eletrônico Epidemiológico, Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf Acesso em: 02 set 2014.

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L. Contaminação de produtos avícolas industrializados e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp. **ARS Veterinária**, v.19, n.1, p.57-62, 2003

CARVALHO, A. F. ; SILVA, D. M. ; AZEVEDO, S. S. ; PIATTI, R. M. ; GENOVEZ, M. E. ; SCARCELLI, E. Detecção dos genes da toxina citolética distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frango. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1054-1061, 2010.

CARVALHO, J,C,A,P.; OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M. Incidência de coliformes totais e fecais em embutido frescal (linguiça) comercializada na cidade de Niterói. **Higiene Alimentar**, v.4, n.2/3, p.136-137,1985.

CASTAGNA, S. M. F. **Associação da prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e a contaminação de embutidos tipo frescal**. 110p Tese - (Doutorado em Ciências Veterinárias na área de Bacteriologia) Porto Alegre, 2004.

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARX, P. CANAL, C. W.; CARDOSO, M. Presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas e linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.3, p.300-306, 2004.

CASTELIJN, G.A.A.; PARABIRSING, J.A.; ZWIETERING, M.H.; MOEZELAAR, R.; ABEE, T. Surface behavior of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Bradenburg* and *S. Infantis*. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v.161, p.305-314, 2013.

CASTRO, A. G. M.; GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; TORRES, A. P; CARDOSO, M. V.; PASCHOAL, A. P.; SOUZA, C. A. I.; CARRASCO, S. Monitoramento de *Campylobacter* spp ao longo da linha de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.64, p.21-26, 1997.

CENCI-GOGA, B.T. et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**, v.66, p.1693-1696, 2003.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of listeriosis – United States**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm>. Acesso em: 17 dez. 2013.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Salmonellosis – General Information. Division of Bacterial and Mycotic Disease**. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/samonellosis_g.htm. Acesso em: 09 agosto 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Surveillance for foodborne-disease outbreaks - United States, 1993-1997. Appendix B - Guidelines for confirmation of foodborne-disease outbreaks**. CDC Surveillance Summaries, MMWK, 49 (SS-1): p, 54-62, 2000.

CERQUEIRA, A.M.; GUTH, B.E.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.70, n.1/2, p.111-121, 1999.

CERQUEIRA, A.M.F.; TIBANA, A.; GUTH, B.E.C. High occurrence of shiga like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.60, p.177-180, 1997.

CHAVES,G.M.C.; GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P. Avaliação Microbiológica de linguiça frescal suína comercializada no Município do Rio de Janeiro-RJ. **Higiene Alimentar**, v.14, n.73, p.48-52, 2000.

CHEN, J.; ZAHNG, X.; MEI, L.; JIANG, L.; FANG, W. Prevalence of *Listeria* in Chinese food products from 13 provinces between 2000 and 2007 and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.6, n. 1, p. 7-14, 2009.

CHEN, T. R. et al. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p.189-197, 2004.

CHIARINI, E.; TYLER, K.; FARBER, J.M; PAGOTTO, F.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: manual and automatic evisceration. **Poultry Science**, v. 88, n. 4, p. 791-797, 2009.

CHIU, T.; PANG, J.; HWANG, W.; TSEN, H. Development of PCR primers for the detection of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis based on the fliC gene. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 8 p. 1575-1580, 2005.

CHIU, C.H.; SU, L.H.; CHU, C. *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, p. 311-322, 2004

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**, v.15, p.532-537, 1993.

CLARK, C. G.; PRICE, L.; AHMED, R.; WOODWARD, D. L.; MELITO, P. L.; RODGERS, F. G.; JAMIESON, F.; CIEBIN, B.; LI, A.; ELLIS, A. Characterization of waterborne outbreak associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. **Emerging Infectious**, v. 9, n. 10, 2003

CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. *Salmonella*. In: **GYLES, C.; CHARLES, O. T. Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames: Iowa State University, 2 ed., p. 133-153, 1993.

CLARKE, S.C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* – an emerging problem? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 41, p. 93 - 98, 2001.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. Direct identification in food samples of *Listeria* sp and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6273-6282, 2002

CORTEZ, A. L. L.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; SALOTTI, B. M. VIDAL-MARTINS, A. M. C. Coliformes fecais, Estafilococos coagulase positiva (ecp), *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em linguiça frescal. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 215-220, 2004.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; IKUNO, A.A.; BÜRGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Identification of *Salmonella* spp. in isolates from chicken abattoirs by multiplex – PCR. **Research Veterinary Science**, v.81, p. 340-344, 2006.

COSTA, C. A. R. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo**. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, 2010.

COSTALUNGA, S. & TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 342-346. 2002.

DESTRO, M. T.; DE MELO SERRANO, A.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v. 2, n. 2, p. 110-112, 1991.

DI GUARDO, G.; FONTANELLI, G.; PANFILI, G. Occurrence of *Salmonella* in swine in the Latim Region (Central Italy) from 1980 to 1989: a retrospective study. **Veterinaria Quaternali**, v.14, p.62-65, 1992.

DIAS, T.C.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; PERES, J.N. Chicken carcasses as a source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.32, n.6, p.414-418, 1990.

DUFFY, G.; CLOAK, O.M.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.49, p.151-159, 1999.

ECHEVERRIA, P., SAVARINO, S. J., YAMAMOTO, T. *Escherichia coli* diarrhoea. **Bailliere's Clinical Gastroenterology**, v.7 (2), p.243-262, 1993.

EDUARDO, M. B. P., KATSUYA, E. M. & BASSIT, N. P. Características dos surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a restaurantes no estado de São Paulo - 1999-2002. **Higiene Alimentar**, v.17, p. 60-61, 2003.

EFSA, European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in slaughter pigs in the EU 2006–2007. **EFSA Journal**. Parma, v.206, p.1–111, 2009.

EL-KHATEIB, T. Microbiological status of Egyptian salted meat (Blaterma) and fresh sausage. **Journal of Food Safety**, v. 17, p. 141-150, 1997.

ERICKSON, M.C.; DOYLE, M.P. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v.70, n.10, p.2426-2449, 2007.

ESCARTIN, E. F.; CASTILLO, A.; HINOJOSA-PUGA, A.; SALDAÑA-LOZANO, J. Prevalence of *Salmonella* in chorizo and its survival under different storage temperatures. **Food Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 479-486, 1999.

EUZÉBY, J.P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/staphylococcus.html> Acesso em: 06 set. 2014.

EVANGELISTA J. **Tecnologia de Alimentos**, Ed. Atheneu, São Paulo, 2000.

FANTELLI, K.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n.1, p. 63-69, 2001.

FARBER, M. & PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**. v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FEDORKA-CRAY, P.J.; WHIPP, S.C.; ISAACSON, R.E.; NORD, N.; LAGER, K. Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 41, p.333-344, 1994.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. **Enfermidades bacterianas**. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doenças das aves. Campinas: Facta, cap.4, p. 457-47, 2009.

FLORENTINO, E. R. et al. Avaliação da qualidade microbiológica da carne moída comercializada no município de Campina Grande, PB. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 38-41, 1997.

FOLEY, S. L., AND A. M. LYNNE. Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**. Savoy, v. 86, p.193–187, 2008

FORBES, T. L.; HANDLING, G.E.J. Endovascular repair of Salmonella-infected abdominal aortic aneurysms: A word of caution. **Journal of Vascular Surgery**. New York, v. 44, p. 198-200, 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Artmed, p. 75, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia Alimentar**. São Paulo: Atheneu, p. 181, 1996.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Ed. Atheneu, São Paulo, p.182, 2006.

FRANCO, B.D.G.M. **Métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos: estudo crítico e avaliação de novas metodologias**. 128f Tese (Livre-Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo São Paulo), 1994.

FRANCO, R. M. Diferentes métodos de isolamento de *Campylobacter jejuni* em alimentos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 2, n. 3, p. 91-96, 1995.

FRAZIER, W. C; WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos**. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha, p. 523, 1978.

GALBRAITH, N.S.; BARRET, N.J.; STANWELL-SMITH, R. Water and disease after Croydon: A review of water-borne and water-associated disease in the UK 1937-1986. **Journal Institute of Water & Environment Management**, n. 1, p. 7-21, 1987.

GARCIA – ALJARO, C., MUNIESA, M., BLANCO, J.E., BLANCO, M., BLANCO, J., JOFRE, J., BLANCH, A. R. Characterization of Shiga toxin – producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. **FEMS Microbiology Letters**. v. 246, p.55-65, 2005.

GARCIA, S. et al. **Avaliação da segurança microbiológica de linguiças tipo frescal coletadas no município de Londrina**. In: congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos, 17. Resumos Fortaleza: SBCTA, Universidade Federal do Ceará, v.1, p.112, 2000.

GERMANO, P. M. L. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, v. 7, n. 27, p. 6-11, 1993.

GHAFFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G. A seven-year survey of *Campylobacter* contamination in meat at different production stages in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 111-120, 2007.

GILLESPIE, I.A.; O'BRIEN, S.J.; ADAK, J.K.;WARD, L.R.; SMITH, H.R. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992–2002: where are the risks? **Epidemiology and Infection**. Cambridge, v. 133, p.795–801, 2005.

GIOVANNINI, A.; PRENCIPE, V.; CONTE, A. Quantative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. **Food Control**, v. 15, n. 2, p. 139-144, 2004.

GOMES-NEVES, E. ANTUNES, P.; TAVARES, A.; THEMUDO, P.; CARDOSO, M.F.; GÄRTNER, F.; COSTA, J.M.; PEIXE, L. *Salmonella* crosscontamination in swine

abattoirs in Portugal: Carcasses, meat and meat handlers. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.157, p.82–87, 2012.

GOUIN, E.; MENGAUD, J.; COSSART, P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, p.3550-3553, 1994.

GRAVANI, R. **Incidence and control of *Listeria* in food processing facilities**. In ***Listeria, Listeriosis and Food Safety***, ed. Ryser, E.T. and Marth, E.H. New York: Marcel Dekker p. 657–709, 1999.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X.. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*** 9ed, Instituto Pasteur, Paris. 2007.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M.L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A. M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 217-225, 2004.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 n47 to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

GUTH, B.E.; LOPES DE SOUZA, R.; VAZ, T.M.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.5, p.535-536, 2002.

GYLES, C L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v.85, n.13, suppl, p.45-62, 2007.

HALD, T. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. **Risk Analysis**, v. 24, p. 251-265, 2004.

HELMS, M.; SIMONSEN, J.; MOLBAK, K. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, n.4, p.498-506, 2006.

HIRSH, D. C. *Salmonella*. In BIBERSTEINS, D V M.; ZEE, Y C. Review of veterinary microbiology. Boston. **Blackwell Scientific Publications**, Inc., p. 110-115, 1990.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênicosanitário de alimentos**. São Paulo: Ed Varela, p. 376, 1993.

HOLT, J.G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, p. 789, 1994.

HOOTON, S.; ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, I.F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin . **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 151, p.157-163, 2011.

HORROCKS, S.M.; ANDERSON, R.C.; NISBET, D.J.; RICKE, S.C. Incidence and

ecology of *Campylobacter jejuni* and coli in animals. **Anaerobe**, v.15, n.1/2, p.18- 25, 2009.

HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, n.3, p.237-257, 2007.

HURD, H.S.; MCKEAN, J.D.; WESLEY, I.V. et al. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. **Journal of Food Protection**, v.64, p.939- 944, 2001

HUSSEIN, H. S.; BOLLINGER, L. M. Influence of selective media on successful detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food, fecal, and environmental samples. **Foodborne Pathogenes and Disease**, v.5, n.3, p.227-244, 2008.

IGLESIAS, M. A. **Análise microbiológica de linguiça suína tipo frescal comercializada na cidade de Pelotas-RS, Brasil.** (Trabalho de Conclusão de Curso), Pelotas, 2010.

IRINO, K.; VAZ, T.M.; KATO, M.A.; NAVES, Z.V.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.; ROCHA, M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.; GUTH, B.E. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in Sao Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.4, p.446-447, 2002.

JACKSON, P.G.G.; COCKCROFT, P.D. **Hanbook of Pig Medicine.** Philadelphia: Saunders-Elsevier. p.296, 2007.

JARRAUD, S. et al. **egc, highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*.** Journal of Immunology, v.166, p.669-677, 2001. Nota de correção em: Journal of Immunology, v.166, p.4260, 2001. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/166/1/669> Acesso em: 30 mar. 2014.

JAY, J. M. **Modern food microbiology.**..New York: Chapman & Hall, 5. ed, p. 661, 1992.

JOHNSON, J. R. Virulência factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**. v.4, n.1, p.80-128, 1991.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.2, p.123-140, 2004.

KICH, J. D.; CARDOSO, M. **Salmonelose** In: SOBESTIANSKY, Y.; BARCELLOS, D., Doenças dos suínos. Goiânia: Canône Editorial, Bacterioses. p.257-264, 2012.

KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N.; NOGUEIRA, M.G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P.M.; CALL, J.E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J.B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 151, p.307-313, 2011.

KOBAYASHI, R. K. T., SARIDAKIS, H. O., DIAS, A., M.G., VIDOTTO, M. C. Molecular identification of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with infant diarrhea in Londrina, Parana, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.31, p. 275-280, 2000.

KONEMAN, E.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, GARY.; SCHRECKENBERGER, PAUL.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 6 ed., p. 389-390, 2008.

KUHNERT, P. BOERLIN, P. FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 24, p. 107-117, 2000.

KUMAR, A.; AGARWAL, R. K.; BHILEGAONKAR, K. N.; SHOME, B. R.; BACHHIL, V. N. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.67, n.1/2, p.153-155, 2001.

LACONHA I., BAGESSEN D.L., REMENTERIA A., GARAIZAR J. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella* Enterica serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human source in three European countries. **Veterinary Microbiology**. v.75, p.155-165, 2000.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. ***Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins**. In. DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association (APHA) Cap.39, p.387-400, 2001.

LÁZARO N S.; TIBANA, A.; HOFER, E. *Salmonella* spp. in healthy swine and in abattoir environments in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9., p. 1029-1033, 1997.

LEE, G. Y.; JANG, H. I. ; HWANG I. G.; RHEE, M. S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 196-200, 2009.

LITTLE, C. L.; RICHARDSON, J. F.; OWEN, R. J.; PINNA, E.; THRELFALL, E. J. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 538-543, 2008.

LOPALCO P. L., GERMINARIO C., DI MARTINO V., FRISOLI L., PAGANO A., QUARTO M., BARBUTI S. **Epidemiologic study and cost analisis of an *Salmonella* Enteritidis epidemic**. Annali d'igiene. v.12, p. 279-285, 2000.

MADEIRA, R.O.; MORON, C.; BUCHBINDER, B.; GONZALEZ, O.; RESBANI, J.C. **Potabilización de aguas – estudio de las distintas alternativas**. In: Seminario regional de calidad de leche, Argentina. Anais, p.173-182, 1997.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.6, p.1332-1344, 2005.

MANCHA, J. S. *Salmonella* spp. en tres tipos de chorizos como peligro dentro de un sistema de análisis de riesgos e identificación de puntos críticos de control (HACCP), en una empacador de la ciudad de México. **Veterinaria Mexico**., v. 30, n. 2, p. 157-165, 1999.

MARQUES, S.C. ; BOARI, C. B.; BRCKO, C. C.;NASCIMENTO, A. R.; PICCOLI, R. H. **Qualidade higiênico-sanitária de linguças tipo frescal comercializadas no**

município de Lavras (MG). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu, Armazém das Letras, p. 394, 2001.

MARQUES, S.C. **Qualidade higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas no município de Lavras (MG).** In: congresso brasileiro de microbiologia, 21. Resumos Foz do Iguaçu: Armazém das Letras, p. 394, 2001.

MATA, M.M. **Avaliação microbiológica de linguiça suína frescal comercializada em feira-livre na cidade de Pelotas-RS.** In: Monografia apresentada a Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, p. 57. 2002.

MAYROHOFER, S.; PAULSEN, P.; SMULDERS, F. J.; HILBERT, F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n.1, p.23-29, 2004.

MEDEIROS, D.T.; SATTAR, S.A.; FARBER, J.M.; CARRILLO, C.D. Occurrence of *Campylobacter* spp. in raw and ready-to-eat foods and in a Canadian food service operation. **Journal of Food Protection**, v.71, n.10, p.2087-2093, 2008.

MENDONÇA, C.; GRANADA, G.G. Coliformes em Açougues de Pelotas-RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5, n.1, p.76-77, 1999.

METHNER, U.; RAMMLER, N.; FEHLHABER, K.; RÖSLER, U. Salmonella status of pigs at slaughter — Bacteriological and serological analysis Ulrich **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 151, p. 15–20, 2011.

MICHAEL, G.B.; SIMONETI, R.M.; CARDOSO, M.R.I. ; COSTA, M. Sorotipos de *Salmonella* isolados em uma propriedade de suínos de terminação no sul do Brasil. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.32, p.525-527, 2002.

MIELE, M. **Consumo de carne suína no Brasil: indicadores, evolução e diferenças regionais.** 2011. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/administracao/artigos/consumo-carne-suina-brasil-t681/124-p0.htm>. Acesso em: 3.out. 2013.

MIWA, N.; KAWAMURA, A.; MASUDA, T.; AKIYAMA, M. An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 361-366, 2001.

MIYASAKI, K. N.; CHIARINI, E.; SANTA'ANA, A. D. S.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. D. M. High prevalence, low counts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in linguiça, a Brazilian fresh pork sausage. **Meat Science**, v. 83, n. 3, p. 523-527, 2009.

MIYUKI, F.; OTOMO, Y.; AHSAN, C. R. A novel single multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**. V.92, p. 289-292, 2013.

MOORE, J.E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J.S.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; MCDOWELL, D.A.; MEGRAUD, F.; MILLAR, B.C.; O'MAHONY, R.; O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J.R.; ROONEY, P.J.; SAILS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v.36, n.3, p.351-382, 2005.

MOREIRA, F.C. **Qualidade microbiológica na linha de processamento de linguiça mista.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu, Aramazém das letras, p. 369, 2001.

MOROT-BIZOT, S. C.; LEROY, S.; TALON, R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 210–210, Apr. 2006.

MORROW, W.E.M.; DAVIES, P.R.; SEE, T. et al. **The prevalence of *Salmonella spp.* in feces on farm and in ceca at slaughter.** In: proceedings of international pig veterinary society congress. Anais Melbourne: IPVS, (Resumo), p.207, 2000.

MOTTA, M. R. A.; BELMONT, M. A. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializadas em supermercados da região Oeste de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 11, n° 78/79, p. 59-62, 2000.

NACHAMKIN, I. Chronic effects of *Campylobacter* infection. **Microbes and Infection**, v.4, n.4, p.399-403, 2002.

MUELLER-DOBLIES, D.; SPEED, K.; DAVIES, R.H. A retrospective analysis of *Salmonella* serovars isolated from pigs in Great Britain between 1994 and 2010. **Preventive Veterinary Medicine**. Amsterdam, v. 110, p.447– 455, 2013.

MULLER, M.; SCHWARZ, P.; KICH, J.D.; CARDOSO, M. Perfil sorológico e de isolamento de *Salmonella* sp. em suínos no início da terminação e ao abate. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 10, p. 931-937, 2009.

NADVORNY, A., FIGUEIREDO, D. M. S. & SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32(1) p. 47-51, 2004.

NASCIMENTO, F. C. A. Aspectos sócio-econômicos das doenças veiculadas pelos alimentos. **Nutrição em pauta**, v. 40, p. 22-26, 2000.

NASCIMENTO, V. P.; SILVA, A. B. **Controle de qualidade de produtos de origem avícola: programas de monitorização em salmonelas.** In: CICLO DE CONFERÊNCIAS DA A.V.E. Porto Alegre. Anais, 1994.

NATARO, J. P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NORMANO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketes in Italy. **International Journal Food Microbiology**. v.98, p.73-79, 2005.

O'BRIEN, A.D.; LAVECK, G.D.; THOMPSON, M.R.; FORMAL, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v.146, n.6, p.763-769, 1982.

OIE. ***Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.** In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, p. 1185 - 1191, 2008. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.03_CAMPYLO.pdf. Acesso em: 04 out. 2013.

OLIVEIRA, A.N. **Bactérias do Gênero *Listeria* em Leite e derivados no Comércio Varejista de Goiânia – Goiás**. Belo Horizonte, 1993. 101f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 1993.

OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M.; CARVALHO, J. C. A. P. Enterobacteriaceae em especiarias utilizadas na elaboração de embutidos cárneos. **Higiene Alimentar**, v. 6, n. 22, p. 27-33, 1992

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Zoonoses and veterinary public health/ Fact sheets**. Programmes and projects, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/entity/en/> Acesso em: 03 out. 2013.

PADUNGTON, P.; KANEENE, J.B. *Campylobacter* spp in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, n.2, p.161-170, 2003.

PALUMBO, S. A.; PICKARD, A.; CALL, J. E. Fate of gram-positive bacteria in reconditioned pork processing plant water. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 2, p. 194-197, 1999.

PANETTA, J. C. Controle higiênico e sanitário dos alimentos de origem animal. Importância social, econômica e de saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 3, n. 3/4, p. 27-33, 1984.

PARDI, M. C. **Ciência, higiene e tecnologia da carne: tecnologia da carne e subprodutos, processamento tecnológico**. Goiânia: UFG. p. 1110, 1993.

PASS, M. A., ODEDRA, R., BATT, R.M. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38 (5), p. 2001- 2004, 2000.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.2, p.598-602, 1998.

PATON, J. C., PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections . **Clinical Microbiology Reviews**. v.11, p. 450-479,1998.

PELCZAR, M. J. Jr; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R., **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Makron Books v. 2, 2. ed., São Paulo, 1997.

PEREIRA, M.L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes* – uma revisão sobre os aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 7, p. 5-12, 1993.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 281-287, 2003.

PIÉRARD, D.; MUYLDERMANS, G.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.11, p.3317-3322,1998.

PINHEIRO, M.S. **Campylobacter** biotipos termofílicos em carcaças de frango e avaliação da metodologia de isolamento de *C. jejuni* e *C. coli*. Rio de Janeiro, 1991. 144p. Dissertação (Mestrado) - Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1991

POLY, F.; GUERRY, P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.24, n.1, p.27-31, 2008.

PREFEITURA MUNICIPAL DA ESTÂNCIA DE SOCORRO, 2013. **Comercialização de produtos embutidos derivados de carne**. Lei nº. 3768/2013. Disponível em: <http://www.socorro.sp.gov.br/leis/lei-no-37682013-comercializacao-de-produtos-embutidos-derivados-de-carne>. Acesso em: 23 Jul. 2014.

REGUA-MANGIA, A. H., GOMES, T. A. T., VIEIRA, M. A. M. ANDRADE, J. R.C., IRINO, K. TEIXEIRA, L. M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Infection**. v. 48, p. 161-167, 2004.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v.308, n.12, p.681-685, 1983.

ROBINS-BROWNE, R. M., HARTLAND, E. L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v.17, p. 467-475, 2002.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K. CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.;LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed. P.512, 2007.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual de Saúde e do Meio Ambiente. Divisão de Vigilância Sanitária. **Relatórios anuais de enfermidades transmitidas por alimentos** (ETA) - 1987-1998. Porto Alegre, 1998.

RISTORI, C. A. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo**. 112p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

RITTER PL, STEWART AL, KAYMAZ H, SOBEL DS, BLOCK DA, LORIG KR. Self-reports of health care utilization compared to provider records. **Journal of Clinical Epidemiologic**, v. 54, n.2, p.136-141, 2001.

RODOLPHO, D.; MARIN, J.M. Isolation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* from butcheries in Taquaritinga city, State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.599-602, 2007.

ROSTAGNO, M.H.; HURD, H.S.; MCKEAN, J.D. et al. **Salmonella** infection in market swine during pre-slaughter holding. In: proceedings of the international pig veterinary society congress. Anais. Ames: Iowa State University, (Resumo), v.1, p.149, 2002.

RUSSO, T.A.; JOHNSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of**

Infectious Diseases, v.181, n.5, p.1753-1754, 2000.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. **Listeria**. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, p.343-353, 2001.

SABIONI, J.G. et al. Avaliação microbiológica de linguiça frescal comercializada na cidade de Ouro Preto, MG. **Higiene Alimentar**. v.12, n.61, p.110-112, 1999.

SAITOH, T.; IYODA, S.; YAMAMOTO, S.; LU, Y.; SHIMUTA, K.; OHNISHI, M.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H. Transcription of the ehx Enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.14, p.4822-4830, 2008.

SAKUMA, H.; FRANCO, B.D.G.M.; FERNANDEZ, H. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in retail raw chicken meat and giblets in São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.23, p.13-16, 1992.

SANTOS, L. R., NASCIMENTO, V. P., FLORES, M. L., ROSEK, H., D'ANDREA, A., ALBUQUERQUE, M. C., RAMPANELLI, Y., MACHADO, N. P., RIOS, S. & FERNANDES, S. A. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, v.16, n.102/103, p. 93-99, 2002.

SANTOS, L.A.G. Detecção de *Listeria monocytogenes* como subsidio a determinação de pontos críticos de controle no abate de suínos. **Bioscience Journal**, v.21, n.2, p. 131-135, Uberlândia, 2005.

SÃO PAULO, 1970 Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo. **Decreto Nº. 52.504, de 28 de julho de 1970**. Disponível em: <http://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto/1970/decreto%20n.52.504,%20de%2028.07.1970.htm>. Acesso em: 23 jul. 2014.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; HARAKAVA, R.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS FERNANDES, F. M.; CAMPOS, F. R.; FRANCISCO, W.; GENOVEZ, M. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, n.4, p.378-382, 2005.

SCHAWARTZ K J. **Salmonellosis**. In STRAW, B E et al. Diseases of swine. Ames: Iowa State University Press, 8^a ed., cap. 39, p. 535-551, 2000.

SCHLECH III, W. F.; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUCCI, R. A.; ALIEN, A. C.; HALDANE, E. V.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. W. Epidemic listeriosis. Evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 203-206, 1983.

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L.H.; KARCH, H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1205-1208, 2000.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded

hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, v.63, n.3, p.1055-1061, 1995.

SCHWARTZ K J. Salmonellosis in Swine. **Cotinuing Educations**, v. 13, n. 1, p. 202-209, 1991.

SILVA, C. A.; SOUZA, E. L.; SOUZA, C. P. Estudo da qualidade sanitária de carne moída comercializada na cidade de João Pessoa, PB. **Higiene Alimentar**, v. 18, nº.126, p.90-95, 2004.

SILVA, G. O.; CARVALHO, A. F.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A. F. C.; PIATTI, R. M.; SCARCELLI, E. Detecção de fatores de virulência em estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de suínos abatidos em frigoríficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1209-1215, 2012.

SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frango. **Higiene Alimentar**, v.12, n. 58, p. 09-24, 1999.

SILVA, M.C.; FARIA, G.S.; DE PAULA, D.A.J.; MARTINS, R.P.; CARAMORI JUNIOR, J.G.; KICHI, J.D.; COLODEL, E.D.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.39, p.266-268, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, p. 295, 1997.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A.; DUVAL, E. H.; JANTZEN, M. M.; TESSMANN, C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de linguiças mistas tipo frescal produzidas na cidade de Pelotas (RS). **Boletim CEPPA**, v.20, n.2, p.257-266, 2002.

SILVA, W P. D.; LIMA, A. S. D.; GRANDA, E. á.; ARAÚJO, M. R. D.; MACEDO, M. R. P. D.; DUVAL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 911-916, 2004

SKIRROW, M. B, BENJAMIN, J. Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.33, p.1222, 1980.

SOBESTIANSKY, J. **Clínica e patologia suína**. Goiânia, p. 383-387, 1999.

SOMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, V.; ROSE, N.; DROUIN, P.; SALVAT, G.; COLIN, P.; Identification by a multiplex PCR-based assay of *Samonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. Letters in **Applied Microbiology**, v.29, p.1-6, 1999.

SPRICIGO, D. A.; MATSUMOTO, R. R.; ESPÍNDOLA, M. L.; FERRAZ, S. M. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguiça frescal supina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 779-785, 2008.

STEINBACH, G., HARTUNG, M., 1999. Attempt to estimate the share of human *Salmonella* infections which are attributable to Salmonella originating from swine. **Deutsche tierärztliche Wochenschrift. Hannover**, v.112, p.296– 300, 1999.

SUZUKI, H.; YAMAMOTO, S. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in the world: a literature survey. **Journal of Veterinary Medical Science**,

v.71, n.3, p.255-261, 2009.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J., eds. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, p.383-409, 2001.

SWANENBURG, M. *Salmonella* in the pork production chain: sources of *Salmonella* on pork. 140f. Tese (doutorado) – Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, The Netherlands, 2001.

SWANENBURG, M.; BERENDS, B.R.; URLINGS, H.A.P. et al. Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork. **Berl. Munchn. Tierarztl. Wschr.**, v.114, p.356-359, 2001a.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; KEUZENKAMP, D.A. et al. *Salmonella* in the lairage of pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection.**, v.64, p.12-16, 2001b.

SWANENBURG, M., URLINGS, H.A.P., SNIJDERS, J.M.A., KEUZENKAMP, D.A., VAN KNAPEN, F. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.70, p.245–256, 2011

TAREMI, M.; DALLAL, M.S.; GACHKAR, L.; MOEZARDALAN, S.; ZOLFAGHARIAN, K.; ZALI, M.R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef meat, Tehran, Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.3, p.401-403, 2006.

THEVENOT, D.; DERNBURG, A.; VERNZOY-ROZAND, C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 7-17, 2006.

THOMAS, D.Y. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. **Infection and Immunity**. v.74, p.4724-4734, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Introducion a la microbiologia**. Zaragoza: Acribia, 3. ed., p. 792, 1993.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed., Porto Alegre: Artmed, p. 894, 2005.

TRABULSI, L. R., KELLER, R., TARDELLI GOMES, T.A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**. v.8, p. 508-513, 2002.

TUTENEL, A. V.; PIERAD, D.; HOFF, J. V.; CORNELIS, M.; ZUTTER, L. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle pigs and chickens at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 63-69, 2003.

VAN HOUTEN, R.; FARBERMAN, D.; NORTON, J.; ELLISON, J. *Plesiomonas shigelloides* and *Salmonella* sorovar Hartford infections associated with a contaminated water supply. Livingston County, New York. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 47, n. 19, p. 394-396, 1998.

VANDAMME, P.; DEL LEY, J. Proposal for a new family, Campylobacteraceae. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v.41, p.451-455, 1991.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens. An illustrated text.** Marison Publishing, p. 501, 1996.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Listeria monocytogenes. In: Foodborne pathogens.** London: Mosby Year Book, p. 327-345, 1991.

VARNAM, A.H.; EVANS M. G. **Foodborne pathogens: an illustrated text.** St Louis: Moby-Year Book, p. 209-34, 1991.

VICENTE, A. C. P. , TEIXEIRA, L. F. M., INIGUEZ-ROJAS, L., LUNA, M.G., SILVA, L., ANDRADE, J. R. C., GUTH, B. E. C. Outbreaks of cholera-like diarrhoea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Brazilian Amazon Rainforest. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v.99, p. 669-674, 2005.

VIDON, D. J. M.; DONZE, S.; MULLER, C.; ENTZMANN, A.; ANDRE, P. A simple chemiluminescence-based method for rapid enumeration of *Listeria* spmicroclonies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 988-993, 2001.

VIDOTTO, M.C., KOBAYASHI, R. K. T., DIAS, A.M.G. Unidentified serogroups enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with diarrhoea in infants in Londrina, Paraná, Brazil. **Journal of Medical Microbiology.** v.49, p.1-4, 2000.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, São Paulo, v.33, n.4, p.406-414, 2009.

VIESTEL, M. A. D.; FRANCO, R. M.; CARVALHO, J. C. A. P. Avaliação bacteriológica de linguiça de frango comercializada no município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, Brasil e a sensibilidade das bactérias frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 1, n. 7, p. 9–13, 2000.

VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS –VE-DTA, 2014. Disponível em: http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf Acesso em: 17 Agosto, 2015.

VILJANEN, M. K., PELTOLA, T., JUNNILA, S. Y., OLKKONEN, L., JARVINEN, H., KUISTILA, M., HUOVINEN, P. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. **Lancet.** v.336, p.831-834, 1990.

VOLF, J.; STEPANOVA, H.; MATIASOVIC, J.; KYROVA, K.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; LEVA, L.; FALDYNA, M.; RYCHLIK, I. *Salmonella entérica* serovar Typhimurium and Enteritidis infection of pigs and cytokine signaling in palatine tonsils. **Veterinary Microbiology.** Amsterdam, v. 156, p.127-135, 2012.

VON LAER, A. E.; LIMA, A. S.; TRINDADE, P.S.; SILVA, W. P. Monitoramento de *Listeria monocytogenes* em planta de processamento de linguiça mista frescal localizada em Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**, v. 1, n. 3, p. 192-198, 2005.

WEGENER, H.C.; BAGER, F. **Pork as a source of human salmonellosis. International symposium on epidemiology and control of *Salmonella* in pork.** v.2, p. 3-8, 1997.

WEINSTEIN, D.L.; JACKSON, M.P.; SAMUEL, J.E.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. **Journal of Bacteriology**, v.170, n.9, p.4223-4230, 1988.

WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; WACHSMUTH, I.K.; RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G.K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.3, p.512-520, 1983.

WILCOCK, B. P.; SCHWARTZ, K. J. **Salmonellosis.** In: **LEMAN, A. D. et al. Diseases of swine.** Ames: Iowa State University Press, 7 ed., p. 570-583, 1992.

WILLIAMS, L. P., NEWELL, K. N. *Salmonella* excretion in joy ridings pigs. **American Journal Public Health**, v. 60, p. 926-929, 2001.

WOLF, M. K. Occurrence, Distribution and Associations of O and H Serogroups, Colonization Factor antigens, and Toxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. v.10 (4), p. 569-584, 1997.

WONG, T.L.; HOLLIS, L.; CORNELIUS, A.; NICOL, C.; COOK, R.; HUDSON, J.A. Prevalence, numbers, and subtypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in uncooked retail meat samples. **Journal of Food Protection**, v.70, n.3, p.566-573, 2007.

WRAY, C. W.; SOJKA, W. J. Reviews of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 383-425, 1977.

YANG, B.; QIAO, L.; ZHANG, X.; CUI, Y.; XIA, X.; CUI, S.; WANG, X.; MENG, X.; GE, W.; SHI, X.; WANG, D.; MENG, J. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. **Food Control**. Guildford, v.32, p.228-235, 2013.

YOUNG, K.T.; DAVIS, L.M.; DIRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.9, p.665-679, 2007.

YÜCEL, N.; ÇITAK, S.; ÖNDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. **Food Microbiology**, v. 22, n. 2/3, p. 241-245, 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis.** 4 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, p.663, 1999.

ZHANG, W. L., KOHLER, B., OSWALD, E., BEUTIN, L., KARCH, H., MORABITO, S., CAPRIOLI, A., SUERBAUM, S., SCHMIDT, H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology** . v. 40(12), p. 4486-4492, 2002.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40,

n.4, p.1441-1446, 2002.

ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; WREN, B.W.; BAJAJ-ELLIOTT, M. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, n.2, p.123-129, 2008.

ANEXOS

Anexo 1: Resultados das análises microbiológicas das amostras de linguiça suína frescal artesanal.

Identificação da Amostra	UFC <i>Staphy C+</i>	NMP Coliformes totais	NMP Coliformes termotolerantes	Cultivo <i>C. coli</i> e <i>C. jejuni</i>	PCR <i>C. coli</i> e <i>C. jejuni</i>
A1	3,8x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A2	1,5x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A3	1,8x10 ³	>1,1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A4	1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	9,3x10 ²	Negativo	Negativo
A5	1,3x10 ³	1,1x10 ⁴	<3,0	Negativo	Negativo
A6	1,8x10 ³	1,1x10 ⁴	9,2x10 ¹	Negativo	Negativo
A7	1,8x10 ⁴	1,1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A8	1,4x10 ³	460x10 ³	1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A9	1,2x10 ³	4,6x10 ³	4,6x10 ³	Negativo	Negativo
A10	6,2x10 ³	1,1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A11	2,2x10 ⁵	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A12	1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	2,3x10 ²	Negativo	Negativo
A13	4,8x10 ³	1,1x10 ⁴	4,6x10 ³	Negativo	Negativo
A14	3,5x10 ³	1,1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A15	4,3x10 ⁵	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A16	3,4x10 ⁵	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A17	Incontáveis	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A18	8,1x10 ⁵	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A19	Incontáveis	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A20	2,0x10 ⁶	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A21	1,3x10 ³	2,4x10 ³	<3,0	Negativo	Negativo
A22	2,9x10 ⁵	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A23	7,0x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A24	8,0x10 ³	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A25	8,6x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A26	1,5x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A27	1,2x10 ³	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A28	6,8x10 ²	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A29	1,1x10 ⁵	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A30	5,0x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A31	6,8x10 ³	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A32	8,1x10 ³	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A33	5,0x10 ¹	2,3x10 ²	2,3x10 ²	Negativo	Negativo
A34	3,5x10 ³	2,4x10 ³	2,4x10 ³	Negativo	Negativo
A35	5,4x10 ²	9,3x10 ²	9,2x10 ²	Negativo	Negativo
A36	3,2x10 ³	1,1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A37	5,7x10 ²	>1,1x10 ⁴	4,6x10 ³	Negativo	Negativo
A38	4,6x10 ³	2,4x10 ³	3,6x10 ¹	Negativo	Negativo
A39	5,9x10 ³	1,1x10 ⁴	2,3x10 ²	Negativo	Negativo
A40	4,0x10 ³	3,6x10 ¹	<3,0	Negativo	Negativo
A41	2,8x10 ³	4,3x10 ²	2,4x10 ³	Negativo	Negativo
A42	1,2x10 ⁴	1,1x10 ⁴	1,5x10 ³	Negativo	Negativo
A43	4,0x10 ³	4,3x10 ²	2,4x10 ³	Negativo	Negativo
A44	1,6x10 ⁵	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A45	6,0x10 ³	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A46	8,4x10 ³	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A47	5,3x10 ³	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A48	8,1x10 ³	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo
A49	1,2x10 ³	4,6x10 ³	4,6x10 ³	Negativo	Negativo
A50	4,0x10 ²	4,0x10 ²	1,1x10 ⁴	Negativo	Negativo

Continuação Anexo 1

Identificação da Amostra	PCR <i>Salm.spp.</i>	PCR <i>S.Typhimurium</i>	PCR <i>S.Enteritidis</i>	PCR <i>S. Choleraesuis</i>	PCR <i>S.Dublin</i>	PCR <i>Listeria sp.</i>
A1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A5	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A17	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A18	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A20	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A23	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A24	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A26	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A27	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A28	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A31	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A33	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A34	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A36	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A37	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A38	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A39	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A42	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A43	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A44	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A45	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A46	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A48	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
A49	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A50	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

A: Amostras artesanais; **Preenchimento em vermelho:** Amostras fora dos padrões aceitáveis para consumo.

Anexo 2: Resultados das análises microbiológicas das amostras de linguiça suína frescal fiscalizada.

Identificação da Amostra	UFC <i>Staphy C+</i>	NMP Coliformes totais	NMP Coliformes termotolerantes	Cultivo <i>C. coli</i> e <i>C. jejuni</i>	PCR <i>C. coli</i> e <i>C. jejuni</i>
F1	Negativo	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F2	Negativo	<3,0	<3,0	Negativo	Negativo
F3	Negativo	$2,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	Negativo	Negativo
F4	Negativo	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F5	Negativo	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F6	Negativo	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F7	$2,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F8	$2,5 \times 10^2$	$9,2 \times 10^1$	$9,2 \times 10^1$	Negativo	Negativo
F9	$1,4 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F10	$1,7 \times 10^2$	$3,6 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	Negativo	Negativo
F11	$8,0 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	Negativo	Negativo
F12	$1,0 \times 10^1$	$4,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F13	$4,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F14	$1,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	Negativo	Negativo
F15	Negativo	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F16	$4,4 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F17	$4,4 \times 10^2$	<3,0	<3,0	Negativo	Negativo
F18	$4,2 \times 10^2$	$3,6 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	Negativo	Negativo
F19	$1,0 \times 10^1$	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F20	$3,9 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	Negativo	Negativo
F21	$5,0 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	Negativo	Negativo
F22	$4,0 \times 10^1$	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F23	$1,0 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F24	$1,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F25	$7,0 \times 10^1$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F26	$2,0 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	Negativo	Negativo
F27	$1,5 \times 10^2$	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F28	$1,0 \times 10^2$	$9,3 \times 10^1$	$9,3 \times 10^1$	Negativo	Negativo
F29	$5,0 \times 10^1$	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F30	$6,0 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	<3,0	Negativo	Negativo
F31	$1,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	<3,0	Negativo	Negativo
F32	$8,0 \times 10^1$	$2,3 \times 10^2$	<3,0	Negativo	Negativo
F33	$5,0 \times 10^1$	$>1,1 \times 10^4$	$3,6 \times 10^1$	Negativo	Negativo
F34	$2,0 \times 10^1$	$2,3 \times 10^2$	$3,6 \times 10^1$	Negativo	Negativo
F35	$7,0 \times 10^1$	$9,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F36	$1,2 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F37	Negativo	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	Negativo	Negativo
F38	Negativo	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F39	Negativo	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F40	Negativo	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F41	Negativo	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F42	Negativo	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	Negativo	Negativo
F43	Negativo	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F44	Negativo	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	Negativo	Negativo
F45	Negativo	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F46	Negativo	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F47	$1,3 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F48	$1,9 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	Negativo	Negativo
F49	$1,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	Negativo	Negativo
F50	$3,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	Negativo	Negativo

Continuação Anexo 2.

Identificação da Amostra	PCR <i>Salm.spp.</i>	PCR <i>S.Typhimurium</i>	PCR <i>S.Enteritidis</i>	PCR <i>S. Choleraesuis</i>	PCR <i>S.Dublin</i>	PCR <i>Listeria sp.</i>
F1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F17	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F18	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F20	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F22	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F23	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F24	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F26	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F28	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F31	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F33	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F34	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F36	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F37	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F38	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F39	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F42	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F43	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F44	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F45	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F46	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F49	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F50	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

F: Amostras fiscalizadas; **Preenchimento em vermelho:** Amostras fora dos padrões aceitáveis para consumo.

Continuação Anexo 3

Amostras	Gene <i>elt</i>	Gene <i>esth</i>	Gene <i>estp</i>	Gene <i>inVE</i>	Gene <i>ast A</i>
A1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
A2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
A3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
A4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A17	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A18	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A23	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
A24	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
A26	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A28	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
A30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
A31	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A33	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A34	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A36	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A37	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A38	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A39	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A42	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A43	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A44	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A45	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
A46	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
A48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A49	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A50	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

A: Amostras artesanais; **Preenchimento em vermelho:** Isolamento positivo para *E. coli* e amostras positivas para detecção do gene.

Anexo 4: Resultados do cultivo de *Escherichia coli* das amostras de linguiça suína fresca fiscalizada e PCR para detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* e *astA*.

Amostras	Isolamento <i>E. coli</i>	Gene <i>stx1</i>	Gene <i>stx2</i>	Gene <i>eae</i>	Gene <i>bfpA</i>	Gene <i>aggR</i>
F1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F5	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F17	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F18	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F23	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F24	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F26	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F27	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F28	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F31	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F33	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F34	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F36	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F37	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F38	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F39	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F42	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F43	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F44	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F45	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F46	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F47	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F48	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F49	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F50	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

Continuação Anexo 4.

Amostras	Gene <i>elt</i>	Gene <i>esth</i>	Gene <i>estp</i>	Gene <i>inVE</i>	Gene <i>ast A</i>
F1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F17	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F18	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F23	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F24	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F26	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F28	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F31	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F33	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F34	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F36	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F37	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F38	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F39	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F42	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F43	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F44	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F45	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F46	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
F48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F49	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
F50	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

F: Amostras fiscalizadas; **Preenchimento em vermelho:** Isolamento positivo para *E. coli* e amostras positivas para detecção do gene.