

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella*
sp. EM EMBUTIDOS SUÍNOS**

Dissertação de Mestrado

Luciane Martins Borowsky

PORTO ALEGRE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella*
sp. EM EMBUTIDOS SUÍNOS**

Autor: Luciane Martins Borowsky*

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Bacteriologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Co-orientadora: Profa. Dra. Verônica Schmidt.

PORTO ALEGRE

2005

* Médica Veterinária

Luciane Martins Borowsky

Comparação de dois métodos de quantificação de *Salmonella* sp. em embutidos suínos

APROVADA POR

Profa. Dra. Marisa R. I. Cardoso
Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADA POR

Prof. Dr. Eduardo César Tondo
Membro da Comissão

APROVADA POR

Prof. Dr. Vladimir Nascimento
Membro da Comissão

APROVADA POR

Profa. Dra. Eliana Knackfuss Vaz
Membro da Comissão

Os meus agradecimentos vão para Verônica Schmidt, Patrícia Schwarz, Marjo Bessa e especialmente para Dra. Marisa Cardoso, por ter acreditado em mim ...

RESUMO

A segurança dos alimentos é uma preocupação mundial e um fator importante na comercialização de produtos de origem animal. A presença de *Salmonella* sp. em suínos ao abate e em produtos do tipo frescal podem representar um risco para a saúde do consumidor. A análise de risco prevê a avaliação de diferentes fatores, entre eles a quantificação do microrganismo presente no alimento. A partir disso, a contribuição do presente estudo foi buscar estabelecer um método confiável de quantificação de *Salmonella* sp. em produtos suínos, uma vez que uma das etapas da análise de risco prevê a quantificação do perigo. No caso de *Salmonella* sp., a técnica da estimativa do Número Mais Provável (NMP) tem sido adotada. Em uma primeira fase desse trabalho, amostras foram quantificadas, individualmente, com três amostras de *Salmonella* Typhimurium (ATTCC15290 e 2 amostras de suínos) em três diferentes contagens, 10^1 , 10^2 e 10^3 UFC. Para o método A, as amostras quantificadas foram adicionadas a 225 mL de água peptonada tamponada, sendo, posteriormente, fracionadas em 3 alíquotas de 50mL, 5mL e 0,5mL. Para o método B, a amostra fortificada foi diluída em água peptonada tamponada até 10^{-3} , sempre em triplicata. Na segunda fase, foram testadas amostras naturalmente contaminadas, utilizando as mesmas metodologias usadas na primeira fase. Todas as alíquotas de ambos métodos foram incubadas a 37°C por 18 horas. Após, cada alíquota foi semeada em caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e incubadas à 42°C por 24 h e após, em ágar Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4) à 37°C por 48 h. Colônias suspeitas foram confirmadas por testes bioquímicos. O número de placas positivas para *Salmonella* sp. foi utilizado para o cálculo do Número Mais Provável, utilizando tabela apropriada. Na segunda fase, os dois métodos foram avaliados em 20 amostras naturalmente contaminadas, mantidas congeladas por até 115 dias. Em 45 ensaios conduzidos, para cada método, em amostras de lingüiça de carne suína contaminadas artificialmente, 38 do método A e 41 do método B resultaram em NMP (95% de intervalo de confiança) concordante com número de UFC de *Salmonella* inoculado. A maioria das amostras naturalmente contaminada de massa de embutido apresentaram contagens $<10\text{NMP/g}$. A variabilidade encontrada entre os valores de NMP médio foi bastante elevada, tanto entre os métodos como entre repetições de um mesmo método. Isto reflete uma das limitações do método de NMP para estimar a contagem de microrganismos e deverá ser considerada quando o método for aplicado em alimentos naturalmente contaminados e quando aplicado em um estudo de análise de risco. Uma vez que o método B foi o que demonstrou valores médios de NMP mais próximos das quantidades inoculadas, sugere-se que este seja adotado em estudos futuros de quantificação de *Salmonella* sp. em produtos de origem suína.

Palavras-chave: *Salmonella* sp., quantificação, suíno, NMP

ABSTRACT

Food safety is a major concern worldwide and an important issue addressed on the international food market. *Salmonella* positive pigs at slaughter and pork have been previously detected in southern Brazil and may represent a hazard for consumer's health. The risk assessment is a modern approach to evaluate the consequences to human of ingesting the microbial hazard. One step of the risk assessment is the evaluation of the hazard level on the consumed food, which needs reliable microbiological quantification methods. Thus, the aim of this study was to compare two protocols for estimation of *Salmonella* sp. Most Probable Number (MPN) in both artificially and naturally contaminated sausage. In a first phase of this study, samples (25g) of pork sausage were artificially contaminated with 10^1 , 10^2 or 10^3 CFU of one of three different *Salmonella* Typhimurium strains (ATCC15290 and two porcine strains). In the method A, artificially contaminated samples were mixed with 225 mL of buffered peptone water (BPW), and divided in 3 aliquots of each 50 mL, 5 mL and 0,5 mL. In method B, fortified samples were added to BPW and triplicate tubes of appropriate dilutions (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) were done. All aliquots of both methods were incubated at 37°C for 18 hours. From each aliquot, 0,1 mL was transferred to Rappaport-Vassiliadis broth, incubated at $42^{\circ}\text{C}/24$ h, and finally a RV loopful was streaked on XLT4 agar. Suspected colonies were confirmed by biochemical tests. The number of positive plates for *Salmonella* sp. was used to calculate the Most Probable Number (MPN). In the second phase of this study, the two methods were evaluated in 115 days frozen, 20 samples naturally contaminated. Of 45 assay was conducted for each method using samples artificially contaminated pork sausage, 38 using the method A and 41 using the method B resulted in estimated MPN (95% confidence interval) in accordance with the amount of *Salmonella* inoculated. Most of the naturally contaminated pork sausage samples had *Salmonella* counts $<10\text{MPN/g}$. There was a high variability between MPN media estimated by the two tested method for one sample, as well as among values estimated by one method in different assays. This reflects one of the limitations of the MPN method for bacterial quantification and has to be considered when applying it for the risk assessment. It was concluded that method B is the most reliable for the estimation of *Salmonella* MPN in pork sausages, since the MPN media values attained by this method was more often in accordance with the *Salmonella* inoculated amounts.

Keywords: *Salmonella* sp., quantification, pork, MPN

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Organograma dos esquemas de quantificação de <i>Salmonella</i> sp. comparadas.....	40
FIGURA 2	Número Mais Provável médio de <i>Salmonella</i> sp. estimado por dois métodos (A e B) em amostras de embutidos de carne suína inoculadas com 10, 100 e 1000 unidades formadoras de colônia (ufc) de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Número mais Provável de <i>Salmonella</i> sp. estimado por dois métodos (A e B) em amostras de embutido de carne suína inoculadas artificialmente com 10, 100 e 1000 unidades formadoras de colônia de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	38
TABELA 2	Número Mais Provável de <i>Salmonella</i> sp. estimado em amostras de massa de embutido de carne suína naturalmente contaminadas, mantidas congeladas, utilizando dois métodos diferentes (A e B)	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	Características Morfológicas e Culturais.....	12
2.2	Nomenclatura.....	12
2.3	Epidemiologia.....	13
2.4	Patogenia do suíno.....	14
2.5	Disseminação.....	15
2.6	Importância na segurança dos alimentos.....	16
2.7	Embutidos.....	17
2.7.1	Presença de <i>Salmonella</i> sp.em produtos suínos.....	19
2.7.2	Detecção de <i>Salmonella</i> sp.....	20
2.7.3	Método de Quantificação.....	22
3	Comparação de dois métodos para estimativa do número mais provável de <i>Salmonella</i> sp. em embutidos de carne suína.....	25
4	DISCUSSÃO GERAL.....	42
5	CONCLUSÕES FINAIS.....	45
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
APÊNDICES		
	APÊNDICE A.....	53
	APÊNDICE B.....	55

1 INTRODUÇÃO

A carne suína é considerada uma das mais importantes fontes protéicas de origem animal disponível para o homem. Com isso, a suinocultura está entre as atividades econômicas voltadas à produção de alimentos para consumo humano, tanto de carne, como de seus derivados. Esta atividade vem aumentando e requer, portanto, um aumento da produção.

Visando este mercado, desde já o Brasil deve preocupar-se com patógenos que possam representar barreiras à comercialização, como é o caso da presença de *Salmonella* sp. nos produtos de origem animal. Ao lado disso, está a importância do microrganismo para a Saúde Pública.

O gênero *Salmonella* por sua larga distribuição no ambiente, e presença em grande variedade de alimentos, constitui um grande problema para a agroindústria. A transmissão de *Salmonella* sp. ao homem ocorre principalmente pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, o que pode resultar em toxinfecções alimentares.

São freqüentes os relatos na literatura sobre o aumento de toxinfecções na população de diversos países, devido ao consumo de produtos suínos contaminados por *Salmonella* sp. O mesmo ocorre sobre o isolamento destes microrganismos em suínos aparentemente saudáveis. A partir disto, comprova-se o risco que a presença de *Salmonella* em suínos pode vir a significar para a população.

A salmonelose humana é um problema mundial. Oficialmente, são registrados, anualmente, entre 40.000 a 60.000 casos da doença nos EUA, mas estimativas do número de casos reais chegam a alcançar 3 milhões.

O risco de que a salmonelose humana seja originada de produtos suínos vem crescendo, uma vez que o mercado demanda um aumento na produção dos derivados considerados de alto risco, tais com carne fresca, lingüiça, produtos defumados, etc. Como estes produtos não sofrem processamento final visando a inativação de *Salmonella*, sua qualidade microbiológica acaba dependendo inteiramente da completa ausência do patógeno na matéria prima. Na literatura, por sua vez, apresentam-se evidências seguras de que a intoxicação alimentar humana por *Salmonella* pode originar-se de produtos suínos, especialmente pela *Salmonella* Typhimurium.

Para estabelecer estratégias de controle é necessário reconhecer e quantificar a infecção em cada estágio da produção para aprimorar a confiança de consumidores em produtos suínos e garantir a qualidade do alimento produzido.

Nos trabalhos realizados pelo setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS têm sido observada uma alta percentagem de animais portadores de *Salmonella* sp. em linfonodos submandibulares e tonsilas no momento do abate. Estes permanecem na carcaça após o abate, e, juntamente com músculos da região da cabeça, são aproveitados como ligas para embutidos e para produção de carne mecanicamente separada, ou seja, podem chegar até o consumidor.

Pela legislação brasileira, *Salmonella* sp. tem que estar ausente em 25g da amostra de alimento. Entretanto, existe uma quantidade mínima necessária do microrganismo para a ocorrência de doença em humanos. Esta quantidade, ou dose infectante pode variar com o sorovar e com o estado de saúde ou tolerância de cada indivíduo. Dependendo do sorovar e do alimento, a dose infectante em pessoas saudáveis pode variar de 10^3 à 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC). Diversos fatores de risco como contaminação cruzada, a falta de higiene na preparação do alimento, o processamento do alimento e a estocagem inadequada, podem permitir que o microrganismo se multiplique até atingir doses infectantes. Recentemente foram desenvolvidos modelos de trabalho descrevendo a transmissão de *Salmonella* sp. dentro da cadeia de produção de carne e produtos, para uma análise de riscos. A partir desses estudos, foi concluído que toda cadeia de produção precisa ser objeto de mais estudo e que são necessários dados quantitativos para uma análise de riscos e do risco microbiológico que diferentes produtos podem representar.

A análise de riscos, por sua vez, necessita quantificar o perigo, o que, no caso de microrganismos, significa determinar o número presente no alimento analisado. No caso específico de *Salmonella* sp., a quantificação não é feita rotineiramente, existindo, porém, na literatura científica algumas publicações a respeito do assunto.

Como as pesquisas para quantificação de *Salmonella* sp. relatadas na literatura apresentam variações não só no método como aos resultados obtidos, o objetivo do presente estudo foi a comparação de dois diferentes métodos para quantificação de *Salmonella* sp., buscando determinar o método mais adequado para ser aplicado em embutidos de carne suína.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características Morfológicas e Culturais

O gênero *Salmonella* sp. é composto por bacilos gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae (HOLT, J.G. et al., 1994). São anaeróbios facultativos, móveis por flagelos peritríqueos, com exceção dos sorotipos Gallinarum e Pullorum (WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J., 1993). Geralmente não fermentam a lactose (CLARKE, R.C.; GYLES, C.L., 1993). São organismos quimiotróficos, apresentando metabolismo tanto respiratório como fermentativo (HOLT, J.G. et al., 1994). A partir da fermentação de D-glicose e outros carboidratos produzem ácido e gás (JAY, J.M., 1992; TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L., 1993). São indol negativos, oxidase negativos, catalase positivos e produzem gás sulfídrico (HOLT, J.G. et al., 1994).

A temperatura ótima para crescimento é 37⁰C (FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M., 1996), porém desenvolve-se numa faixa de crescimento de 7⁰C a 45⁰C, são resistentes à dessecação e ao congelamento, possuindo a capacidade de sobreviver no ambiente por anos (WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J., 1993). No entanto são sensíveis à luz solar e à maioria dos desinfetantes como fenóis, clorados e iodados (SOBESTIANSKY, J. et al., 1999).

O crescimento de *Salmonella* sp. ocorre em um pH ótimo entre 6,5 e 7,5, admitindo uma variação entre 4,5 e 9,0. Valores inferiores a 4,1 inativam e matam a *Salmonella* sp. (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L., 1993).

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

2.2. Nomenclatura

A *Salmonella* sp. recebeu este nome em homenagem ao seu descobridor, Daniel Salmon (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L., 1993). Salmon e Smith, descreveram a *S. Choleraesuis* como agente etiológico de uma doença infecciosa em suínos, posteriormente identificada como sendo a Peste Suína Clássica, em que a *S. Choleraesuis* aparecia como agente secundário (JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N., 1985).

A nomenclatura do gênero *Salmonella* ainda não está totalmente definida. Pelo fato de a classificação atual, baseada em características bioquímicas, apresentar

pouca importância prática, é utilizado como rotina um esquema de identificação denominado esquema de Kauffmann e White, que divide o gênero em tipos sorológicos, tendo por base a composição antigênica das salmonelas com relação aos seus antígenos O (somáticos), Vi (capsulares) e H (Flagelares) (CAMPOS, L.C., 1999).

Há sorovares de *Salmonella* sp. que são adaptados a um hospedeiro específico (Typhi para humanos, Choleraesuis para suínos e o Dublin para bovinos) (SCHWARTZ, K.J., 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, D.C., 1990).

Diferentes sorovares podem infectar o suíno, mas poucos constituem causa significativa de doença, como a Choleraesuis e Typhimurium (SOBESTIANSKY, J. et al., 1999). As infecções de suínos com sorovares comuns ao rebanho não acarretam em sintomas clínicos (SCHWARTZ, K.J., 2000).

2.3 Epidemiologia

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* sp. são fatores importantes na disseminação do microrganismo para os suínos (HIRSH, D.C., 1990; SOBESTIANSKY, J. et al., 1999). Berends, B.R., 1997, estimou que entre 1 e 10% da contaminação de suínos terminados tem origem ainda nas Unidades de Produção de Leitões (UPLs), até 30% das infecções pode ser devido à alimentação com rações contaminadas e as restantes provenientes da microbiota da granja, via contato direto ou indireto com animais portadores.

A utilização de farinhas de origem animal é apontada como principal fonte de introdução de *Salmonella* sp. em rebanhos (NASCIMENTO, V.P.; SILVA, A. B., 1994), embora ingredientes de origem vegetal também possam servir de fonte de contaminação para os alimentos (SCHWARTZ, K.J., 2000).

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* sp. 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, C.W.; SOJKA, W.J., 1977).

2.4 Patogenia nos suínos

Nos suínos, a forma clínica da doença pode se manifestar como uma septicemia aguda ou como uma enterocolite aguda ou crônica (SOBESTIANSKY, J. et al., 1999). No Rio Grande do Sul, existem registros de formas entéricas e septicêmicas (BARCELLOS, D. E. S. N.; et al., 1984), o que ocorre também em outras áreas do Brasil e do mundo. A infecção por *S. Typhimurium* dissemina-se rapidamente entre os suínos, mas a mortalidade é baixa (SCHWARTZ, K.J., 1999). Os suínos podem recuperar-se totalmente, mas alguns poderão permanecer como portadores e excretadores intermitentes por meses (WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J., 1993).

Vários tipos de portadores têm sido identificados: portadores ativos, portadores passivos e portadores latentes. Os portadores ativos excretam *Salmonella* sp. por meses ou anos. Geralmente, os animais desenvolvem este estado após a recuperação da infecção clínica. Esses animais são, algumas vezes, referidos como excretadores persistentes. Os portadores passivos são os animais que ingerem *Salmonella* sp. e esta passa através do intestino, nas fezes, com pouca ou nenhuma invasão nos linfonodos mesentéricos. E os portadores latentes são animais que têm *Salmonella* sp. em seus tecidos, mas geralmente não excretam este microrganismo em suas fezes, sendo que estes animais podem tornar-se excretadores intermitentes.

Certos fatores de estresse podem promover a excreção de *Salmonella* sp. por animais portadores, bem como, levar à ativação ou reativação da infecção nestes animais (WRAY, C.W.; SOJKA, W.J., 1977).

A excreção ativa de *Salmonella* sp. pode ser originada pelo estresse que está associado a vários fatores como a superlotação das baias, a idade, a inanição, a administração de corticóides, o transporte dos animais e, ainda, o tratamento oral com antibióticos (CLARKE, R.C.; GYLES, C.L., 1993). A mistura de lotes de várias propriedades feito nas unidades de terminação também propicia a disseminação da infecção (SOBESTIANSKY, J. et al, 1999). Conforme Berends, B.R. (1998), 90% de novas infecções durante o transporte são decorrentes do estresse e ocorrem com o mesmo sorotipo já presente no rebanho.

O transporte para o abatedouro reduz a resistência do animal (LÁZARO, N.S.; TIBANA, A.; HOFER, E., 1997), levando-o a excretar o microrganismo (WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J., 1993). Desta forma facilita a transmissão oro-fecal de *Salmonella* sp. (LÁZARO, N.S.; TIBANA, A.; HOFER, E., 1997). Conforme

Williams, L.P; Newell,K.N. (2001), 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* sp. pode ser aumentada após o transporte.

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* sp., entrar em contato direto ou indireto com animais excretando, resultando em infecção. Animais que já estão infectados antes de chegarem ao frigorífico são responsáveis pela contaminação das salas de espera e podem também infectar outros animais (SWANENBURG, M., 2001). Lázaro, N.S.; Tibana, A.; Hofer, E., (1997) encontraram 20 % de amostras positivas para *Salmonella* sp. em baias de espera de frigoríficos no Brasil.

Animais portadores contaminados na propriedade ou nas baias de espera podem contaminar o ambiente, os equipamentos e a carcaça no abatedouro (WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J., 1993). Através da inspeção da carne, pode haver exposição dos linfonodos contaminados e contaminação cruzada da carcaça (MÔO, D. et al., 1980). A ocorrência de *Salmonella* sp. em linfonodos intactos na carcaça foi analisada, demonstrando o risco em saúde pública do abate de animais portadores (ALVES, J.C. et al., 1994). Da mesma forma a contaminação cruzada pelo conteúdo intestinal é de grande importância durante o processamento. Swanenburg, M. et al. (1999), observaram que carcaças de suínos com tonsilas onde há presença de *Salmonella* sp. são mais sujeitas à contaminação após o abate, do que carcaças de suínos sem a presença do microrganismo nas tonsilas. A explicação para a associação entre tonsilas e carcaças com *Salmonella* sp. pode ser o fato da contaminação de ambas ser causada mais de forma cruzada, do que por uma extensa infecção por *Salmonella* sp. nos animais.

Lázaro, N.S.; Tibana, A.; Hofer, E. (1997) isolaram 34,8% de *Salmonella* sp. nas tonsilas e linfonodos após o abate. Tendo maior ocorrência de isolados das tonsilas, seguidos dos linfonodos mesentéricos. Swanenburg, M, et al. (2001) encontraram alta prevalência (67%) em tonsilas, amostras de conteúdo retal e linfonodos mesentéricos de suínos abatidos.

Bessa, M.C.; Costa, M.; Cardoso, M. (2004) encontraram 55% de suínos portadores de *Salmonella* sp. em linfonodos e conteúdo intestinal ao abate em

frigoríficos no Rio Grande do Sul. Entre os sorovares mais encontrados, *S. Typhimurium* esteve em posição de destaque. Castagna, S.M.F. et al. (2004 a) demonstraram que a presença de *Salmonella* sp. em linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal de suínos ao abate estava correlacionada com a presença desse organismo em tonsilas e linfonodos mandibulares. Castagna, S.M.F. et al. (2004 b) demonstraram ainda, que a prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate, influenciara a contaminação de embutidos frescal.

2.5 Disseminação

No Rio Grande do Sul, Weiss, L.H.N. et al. (1999) demonstraram a ocorrência de *Salmonella* sp. em 6,4% de fezes de suínos amostrados em granjas de terminação. Silva, L.E. et al (2004) demonstraram que a terminação foi o período crítico de infecção num lote de suínos acompanhado do nascimento ao abate, tendo sido a ração uma das prováveis fontes de contaminação.

A falta de higiene das baias dos suínos, o confinamento e a preparação de alimentação animal nas granjas estão associados com a presença de *Salmonella* sp. nos alimentos de origem suína (SCHWARTZ, K.J., 2000). Desta forma as condições higiênicas das criações e o controle da contaminação fecal são medidas que ajudam a diminuir ou eliminar a infecção nos suínos (ZEBRAL, A. A; FREITAS, C.A. HOFER, E., 1974). A desinfecção deve ser feita em todos os compartimentos, incluindo os corredores entre as baias, não sendo limitada apenas ao piso e às paredes das mesmas (GIBSON, E.A., 1969).

A prevenção é a melhor forma de controle da *Salmonella* sp. (BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTESEN, H. ,1996; BLAHA, T., 1996), o que proporciona maior segurança ao alimento (BLAHA, T., 1996), um menor risco à saúde pública, e a ampliação das áreas de comercialização dos produtos de suínos (SCHWARTZ, K.J., 1996).

2.6 Importância na segurança dos alimentos

Em humanos, os sintomas iniciais da doença são náuseas e vômitos, que ocorrem de 8 a 24 horas após a ingestão do alimento contaminado e, geralmente, não persistem após o início da diarreia. Durante a salmonelose aguda, as fezes podem conter um bilhão de células de *Salmonella* por grama. Alguns sorovares de *Salmonella* podem penetrar e ganhar acesso à corrente sanguínea, causando bacteremia (ATLAS, 1997), entretanto as infecções apresentam maior tendência de permanecerem localizadas.

A salmonelose vem aumentando gradativamente na população humana. Um dos fatores que contribui para a disseminação é o aumento do consumo de produtos alimentares de origem animal. As enfermidades transmitidas por alimentos causadas por *Salmonella* são consideradas um dos mais importantes problemas de Saúde Pública, tanto nos países em desenvolvimento como nos países desenvolvidos (JAKABI, M., 1999).

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo, representando 44% do consumo total, seguida das carnes bovinas (28%), de aves (24%) e de outras carnes (4%). No Brasil, cerca de 70% da produção suinícola é voltada para a produção de produtos industrializados, como presuntos, lingüiças, defumados, salsichas e mortadelas (GIROTTI, A.F., 2004)

Conforme Hald, T.; Wegener, H.C. (1999), entre as fontes de infecções humanas por *Salmonella*, 40-45% são provenientes de ovos e 10-15% de produtos suínos. A carne suína é responsável por aproximadamente 15% de todos os casos de salmonelose em humanos no leste Europeu e América do Norte.

Para reduzir a prevalência de salmonelose em humanos associada com o consumo de carne suína, é importante que carcaças e outros produtos, não estejam contaminados por *Salmonella* após o abate. Para reduzir a ocorrência de *Salmonella*, as carcaças contaminadas no frigorífico deveriam ser identificadas e separadas para posterior processamento, o que se torna inviável na prática (SWANENBURG, M. et al., 1999). Roberts, D. (1975) Bello-Pérez, L. A. (1993) apontam como importante fonte de *Salmonella* sp. os embutidos, como salsichas e as lingüiças, por serem preparadas com carne fresca de bovinos e suínos, ou devido ao fato de que as mesmas não passam pelo processo de cocção.

2.7 Embutidos

Embutidos ou carnes preparadas embutidas são 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, 1978).

De acordo com Martins, J.F.; Terra, N.N. (1985), o embutido será designado pelo seu nome, seguido da classe a que corresponde, ou tipo, ou espécie animal de que provém, podendo ser seguido ainda de complementações elucidativas quanto às características peculiares. Pode-se exemplificar como “Lingüiça defumada”, “Salsicha tipo Viena”, “Pastas de fígado”.

Os embutidos são classificados com critérios básicos. De acordo com seu processo de fabricação, são classificados em frescos, cozidos, defumados e secos. Segundo a sua composição em simples e mistos e de acordo com as suas características em chouriço, lingüiça, morcela, mortadela, paio, queijo de porco ou ralado, salame, salsicha e patê ou pasta (SÃO PAULO, 1978).

Os embutidos crus são curados a frio e/ou a quente, dividindo-se em frescos e maturados, pois a cura pode ser dividida em duas fases: a cura propriamente dita (seca ou úmida) e a maturação e secagem. Podem ainda apresentar-se defumados ou não. Os embutidos maturados dividem-se em secos e semi-secos, apresentando-se em ampla variedade devido às muitas variáveis envolvidas no seu processamento, o que acaba por dificultar a exata classificação destes produtos (HAACK, O. N.; BERNARDI, R.; RIVERO. M., 1991).

A indústria emprega grande variedade de carnes como matéria-prima cárnea, desde os segmentos musculares até vísceras, gorduras, sangue, pele e ligamentos. Dependendo do produto, é precedida a escolha do tipo de tecido, da qualidade, do estado e da espécie ou espécies de animais a serem empregadas (PARDI, M.C, 1993).

Os embutidos deverão ser preparados de carne e outros tecidos animais em perfeito estado de conservação. De acordo com o tipo de embutido e suas peculiaridades, podem entrar na sua composição tendões, cartilagens ou aponeuroses, porém a proporção não poderá ser preponderante ao exame microscópico (SÃO PAULO, 1978).

Os embutidos de carne compreendem basicamente duas classes, aqueles preparados a partir de misturas de carnes moídas em maior ou menor grau como as lingüiças frescas, lingüiças defumadas e salames; e os embutidos preparados a partir de emulsões, como as mortadelas, salsichas e similares, também chamados de embutidos cozidos (MARTINS, J.; TERRA, N.N., 1985).

Os principais componentes da emulsão ou massa são a carne, água, gordura, sal, aditivos e condimentos, proteínas suplementares e os amidos. A massa dos embutidos é uma emulsão de gordura em água, portanto do tipo óleo-água, onde as gotículas de gordura estão distribuídas de maneira relativamente uniforme e são mantidas em suspensão pelas proteínas solúveis da carne (MARTINS, J.; TERRA, N.N., 1985).

De acordo com Haack, O. N.; BernardI, R.; Rivero, M.. (1991), as características das matérias-primas, carne e gordura, são de importância decisiva para a elaboração de embutidos crus em condições adequadas. A carne deve proceder de animais sãos. Além disso, a carne dos animais submetidos a extremas condições fisiológicas, isto é, às chamadas influências de estresse, exibe uma maturação defeituosa, que se traduz em uma acidificação deficiente ou num elevado valor do pH.

Da mesma forma, animais abatidos em condições precárias e sem higiene, carcaças mal resfriadas, carnes desossadas sem os cuidados devidos não podem ser consideradas como matéria-prima de boa qualidade e certamente, mais cedo ou mais tarde, vão ocasionar problemas (PARDI, M. 1993).

Banwart, J. (1989), Jay, J.M. (1992) e Strapazzon, R. (1997) citam a deterioração microbiológica como a mais grave de todas. É causada por microrganismos que decompõe rapidamente as proteínas e produzem como resíduos desta decomposição as toxinas que podem causar efeitos indesejáveis ao consumidor. A contaminação da carne por microrganismos pode ocorrer de fonte endógena ou exógena.

Esses autores comentam que a contaminação endógena é causada por microrganismos que já estão presentes no tecidos do próprio animal. O grau desta contaminação pode ser diminuída pela utilização de técnicas e práticas adequadas de sangria, refrigeração das carcaças, pela boa origem dos animais e um bom preparo destes animais antes do abate. Já a contaminação exógena é causada por microrganismos existentes no ambiente ou nos manipuladores da carne. Para reduzir os níveis deste tipo de contaminação, é preciso haver uma boa limpeza das instalações, máquinas, mesas e ferramentas, assim como uma rigorosa disciplina quanto à higiene dos manipuladores.

Segundo Haack, O. N.; Vargas, C. R.; Stifelmann, R.. (1987), a contaminação mais importante da carne é, sem dúvida, de origem externa, uma vez que admite-se que a massa interna da carne não contém microrganismos, ou estes são muito escassos. Por outro lado, podem ser encontrados microrganismos nos linfonodos, medula óssea e no próprio músculo. Comentam também que a *Salmonella* sp. é uma das principais bactérias patogênicas encontradas nas carnes e seus derivados.

2.7.1 Presença de *Salmonella* sp. em produtos suínos

A presença de *Salmonella* sp. em produtos suínos já tem sido relatada em vários países. Estudos realizados na Flórida por Galton, M.M.; Lowery, W.D.; Hardy,

A.V. (1954), relatam uma alta porcentagem de salsichas de carne suína fresca positiva para *Salmonella* sp. Posteriormente no Colorado, Richardson, J.H.; Galton, M.M.; Starr, L.E. (1960), analisaram 106 amostras de salsichas de carne suína, obtidas de mercados varejistas locais, tendo sido isolada *Salmonella* sp. em 38% das mesmas.

Em uma pesquisa realizada na Inglaterra, ao analisarem 3.309 amostras de salsichas de suínos encontrou-se *Salmonella* sp. em 786 das amostras (ROBERTS, D. et al., 1975). Mais tarde, na Nigéria, foi encontrada a presença de *Salmonella* sp. em 42% das amostras analisadas de salsicha fresca e 56% nas amostras de salsicha cozida (OYEKOLE, O.D.; HASSAN, J.O., 1984).

Estudos mais recentes, realizados por Sinell, H.J. et al. (1990) na Alemanha, avaliaram carne suína moída, encontrando uma prevalência de 75,3%. No México, Bello-Pérez, L.A. (1993) verificou que de 9.322 amostras de alimentos, encontrou-se *Salmonella* sp. em 30% das lingüiças e 33% dos salsichões. Da mesma forma, Escartín, E.F. et al. (1999), no mesmo país, encontraram 88,3% de embutidos positivos.

Da mesma forma, Chaves, G.M.C. et al. (2000), no Rio de Janeiro, encontraram 10% das amostras de lingüiça frescal de origem suína positivas para *Salmonella* sp, enquanto que Lobo, M.V. et al. (2001) encontraram 5% de salames coloniais positivos no Rio Grande do Sul.

Os resultados acima, vêm ao encontro da afirmação de Jay, J.M. (1992), quando comenta que é imprescindível a obtenção de dados sobre a presença de *Salmonella* sp. na carne e produtos suínos, para conquistar a confiança do consumidor e permitir que processos de checagem e monitoramento garantam a qualidade do alimento a ser consumido.

Os métodos de cocção utilizados para a carne suína e seus produtos devem ser eficientes à fim de destruir a *Salmonella* na profundidade da carne (74⁰C no centro geométrico). A contaminação cruzada, a falta de higiene na preparação do alimento e a estocagem inadequada, são fatores de risco envolvidos com a infecção alimentar, permitindo que o microrganismo se multiplique até atingir doses infectantes (SOJKA, W.J; GITTER; M., 1961).

2.7.2 Detecção de *Salmonella* sp.

Pela legislação brasileira, *Salmonella* sp. tem que estar ausente em 25g da amostra de embutido. Entretanto, existe uma quantidade mínima necessária do microrganismo para a ocorrência de doença em humanos. Esta quantidade, ou dose

infectante, pode variar em função do sorotipo e da afinidade dos mesmos a determinadas espécies animais (JAKABI, M. et al., 1999).

O procedimento para a detecção da salmonela é baseado principalmente na técnica microbiológica convencional, preconizada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Bacteriological Analytical Manual (BAM) e Organização Internacional de Epizootias (OIE) (OLIVEIRA, G., 2000).

As fases de detecção de *Salmonella* sp. podem ser divididas em pré-enriquecimento não seletivo, enriquecimento seletivo, semeadura em meio sólido seletivo, triagem bioquímica, confirmação bioquímica e sorologia .

O meio de cultura utilizado no enriquecimento não seletivo é a Água Peptonada Tamponada 1%, nessa etapa amostras de 25 gramas são incubadas a 37⁰C de 18 a 24 horas (BAGER, F.; PETERSEN,J., 1991) essa etapa inicial é utilizada para permitir que as células bacterianas, quando lesadas, possam se recuperar e multiplicar, aumentando a probabilidade de que *Salmonella* sp. seja detectada.

A etapa de enriquecimento seletivo, permite o crescimento preferencial de *Salmonella* sp., inibindo o crescimento da microbiota competitiva, geralmente através de compostos tóxicos, pH, e da pressão osmótica (BAGER, F.; PETERSEN,J., 1991). O caldo Tetrionato torna-se seletivo para o isolamento de *Salmonella* sp. pela ação do tetrionato, formado no meio, pela reação entre o tiosulfato e a solução de iodo (MÜLLER, 1987). A adição ao caldo Tetrionato de bile bovina e verde brilhante ao Caldo Tetrionato, aumenta a seletividade do mesmo, inibindo a microbiota Gram-positiva e retardando o crescimento de outras enterobactérias (MÜLLER, 1987).

O caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) tem demonstrado uma grande eficiência na recuperação de *Salmonella* sp. e um alto nível de seletividade (BAGER, F.; PETERSEN,J., 1991), a eficiência desse meio é devida à capacidade de multiplicação da *Salmonella* sp. em pressões osmóticas relativamente elevadas (concentração final do cloreto magnésio hexaidratado de 36g/L de meio), pH relativamente baixo (5,2), temperaturas de 42⁰C, e por estas bactérias apresentarem necessidades nutricionais modestas. O volume a ser inoculado do pré-enriquecimento, no caldo RV deve estar na proporção de 1:100 (RAPPAPORT-VASSILIADIS, 1987).

Quanto maior for a seletividade obtida na etapa de enriquecimento seletivo, menor será o crescimento de microrganismos competidores no ágar e melhor serão as condições para o isolamento de *Salmonella* sp. A etapa de semeadura em meio sólido seletivo é feita a partir de alíquotas dos caldos de enriquecimento seletivo. O ágar, por

sua vez, deverá apresentar um nível de seletividade que diminua o crescimento de bactérias competidoras, que não foram inibidas na etapa anterior e um sistema indicador que permita diferenciar *Salmonella* sp. da microbiota acompanhante (SHERROD, P.S. et al. 1995).

Exemplos de meios sólidos frequentemente utilizados na rotina laboratorial são o ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS) e o Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4). O ágar BPLS utiliza a capacidade dos microrganismos degradarem ou na a lactose e sacarose. A degradação do açúcar resulta na acidificação do meio, sendo visualizada através da viragem do vermelho de fenol para amarelo. Como a *Salmonella* sp. não fermentam tais açúcares, suas colônias terão uma coloração rosa ou serão translúcidas (BPL, 1996). O ágar XLT4 inibe os competidores como *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., e *Providencia* sp., o que permite um melhor isolamento de *Salmonella* sp., diminuindo os falso negativos. Detecta-se *Salmonella* sp. neste meio pela produção de ácido sulfídrico (XLT4, 1996). O ácido sulfídrico formado pela degradação do tiosulfato de sódio reage com íons férrico presentes no meio, formando um precipitado preto nas colônias. Além disso, a base do meio contém lisina, a qual a *Salmonella* sp. é capaz de degradar até cadaverina, provocando a elevação do pH do meio, visualizada pelo halo violeta produzido pela viragem do indicador vermelho de fenol.

A confirmação bioquímica é feita nas colônias supostamente classificadas como *Salmonella* sp. encontradas no meios sólidos. Testes utilizando o ágar Ferro Lisina (LIA) e ágar Ferro Tríplice Açúcar (TSI) são utilizados como triagem inicial, a partir das quais faz-se então uma série de provas bioquímicas adicionais, como utilização do citrato, urease, agar SIM, entre outros. Se os testes forem indicativos de *Salmonella* sp. então é realizada a confirmação sorológica, através da técnica de aglutinação com soro polivalente anti-O.

2.7.3 Métodos de quantificação

A quantificação de *Salmonella* sp. em alimentos não é uma prática rotineira, entretanto, esta informação é desejável nas estratégias de redução de toxinfecção alimentar, tanto na avaliação do risco microbiológico como na avaliação de substâncias e procedimentos para controle de *Salmonella* sp. em produtos (ESCARTIN, F.E., 1995; BUCHANAN, R.L, DEROEVER, C.M., 1993) .

As mudanças nas técnicas de processamento e distribuição de alimentos, assim como a emergência de novos patógenos, alteraram a epidemiologia das doenças

de origem alimentar. Com isso, estão surgindo novas formas de avaliação dos riscos na produção de alimentos seguros. Atualmente há um aumento na aplicação de análise de risco, ou seja, para avaliar os riscos que um alimento possa vir a causar na saúde dos consumidores, permitindo a estimativa da probabilidade de ocorrer consequências adversas do consumo de algum alimento. Existem quatro componentes da análise de risco: a identificação do perigo, que consiste na identificação dos agentes biológicos, químicos e físicos (microrganismos e toxinas) capazes de causar efeitos adversos à saúde; avaliação da exposição, que é a avaliação qualitativa e/ou quantitativa estimada da dose do organismo na qual o consumidor é exposto ao ingerir o alimento; análise da dose-resposta, ou seja, é o processo de obter informação da quantidade de organismos que podem causar doença no consumidor; e a caracterização do risco, que compreende a severidade, as consequências econômicas e sociais que podem estar envolvidas (FORSYTHE, S.J., 2002; OSCAR, T.P. 2004).

A resposta da população à exposição é altamente variável, refletindo no fato que a incidência da doença depende da variedade de fatores como a virulência do patógeno, o número de células ingeridas e a condição de saúde do consumidor (NOTERMANS, S.; TEUNIS P., 1996; BUCHANAN, R.L., 2000; HOORNSTRA, E., NOTERMANS, S.; 2001).

A dose resposta para uma infecção por *Salmonella* do grupo não tifóide em humanos saudáveis é de 10^5 a 10^{10} , entretanto há registro de surtos com doses $< 10^3$, podendo estar relacionada com uma baixa resistência dos consumidores, maior virulência das amostras de *Salmonella* e/ou maior quantidade ingerida do alimento (BLASER, M.J. ; NEWMAN, L.S., 1982).

As técnicas de quantificação na microbiologia reflete a qualidade da matéria-prima, bem como as condições de processamento, manuseio e estocagem (JAY, J.M., 1992), permitindo estimar a vida de prateleira do alimento em questão. As técnicas usualmente utilizadas nos laboratório incluem a contagem padrão em placa ou contagem de aeróbios mesófilos. A execução desta técnica é bem simples, consistindo no plaqueamento de alíquotas da amostra, homogênea e diluída, em meio de cultura-padrão como o Plate Count Agar (PCA). As placas são, então, incubadas em condições de tempo e temperaturas adequados, para que haja o desenvolvimento das colônias que serão enumeradas com o auxílio de contadores. O resultado obtido é expresso sob forma de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por unidade de volume de alimento.

Outra abordagem que pode ser utilizada é a do Método do Número Mais Provável (NMP). Essa técnica, que é realizada através de seriadas diluições de amostras alimentares em meios de cultura apropriados, que a seguir são incubados em temperatura apropriada. Os tubos com crescimento positivo são submetidos a testes confirmatórios. O número de organismos na amostra original são determinados através de tabelas para estimativa de NMP, baseados no trabalho original de McCrady (1915). Entre as vantagens desse método está sua relativa facilidade de execução e o fato que grupos específicos de organismos podem ser determinados através de cultivo em meio seletivo líquido. Esse tem sido o método de escolha para contagem de coliformes fecais. Entre as limitações, está o fato de não ser um método preciso de análise e sim uma estimativa. Geralmente a média de NMP é expressa, entretanto verifica-se que em um intervalo de 95% de confiança, os valores máximos e mínimos estão bastante distantes (JAY, J.M., 1992).

O fato de *Salmonella* sp. estar freqüentemente acompanhada de microbiota interferente, necessitando de etapas de enriquecimento seletivo em meios líquidos para que se alcance uma maior eficiência de seu isolamento, determina que o método do NMP seja o mais adequado para sua quantificação.

Na literatura há poucos relatos da aplicação do NMP para quantificar *Salmonella* sp. No trabalho de Dufrenne, J. et al. (2001) usando lavados de carcaças de frango resfriadas e congeladas, foi encontrado 89% e 68%, respectivamente, com quantidade menor de 10 *Salmonella* por carcaça. Escartin, E.F. et al.(1995) analisaram 61 amostras de carne de suínos coletadas em açougues no México, dessas 8% apresentaram contagem $<0,03 \text{ NMP g}^{-1}$ e 28, 54 e 74%, $<0,9$, 9 e 23 NMP/g, respectivamente. Sineel, H.J. et al. (1990) avaliaram 174 amostras de carne suína moída positivas para *Salmonella* sp. nas quais o valor de NMP em 97,3% das amostras, foi determinado como 1.000 por 100 gramas de amostras. Em trabalho conduzido por Castagna, S.M.F. et al. (2004b) quatro amostras de embutidos suínos positivas para *Salmonella* sp., apresentaram 93 NMP/g, 150 NMP/g e $<3\text{NMP/g}$ (duas amostras).

**COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS PARA ESTIMATIVA DO
NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE *Salmonella* sp. EM EMBUTIDOS DE CARNE
SUÍNA**

Luciane Martins Borowsky¹; Verônica Schmidt¹; Marisa Cardoso^{1*}

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Corresponding author. Mailing address: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de
Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090. 90540-000, Porto
Alegre, RS, Brasil. E-mail: mcardoso@vortex.ufrgs.br

RESUMO

A ocorrência de *Salmonella* na cadeia de produção de suínos tem sido relatada, tornando necessário estudos que avaliem o risco que produtos de origem suína podem representar ao consumidor. A identificação de risco passa pela quantificação do microrganismo no produto avaliado. No caso de *Salmonella* sp., a técnica da estimativa do Número Mais Provável (NMP) tem sido adotada. O objetivo do presente estudo foi comparar dois métodos propostos para a estimativa do NMP de *Salmonella* sp. para definir aquela com melhor aplicabilidade para embutidos de carne suína. Em uma primeira fase, amostras de embutido, inoculadas artificialmente com três linhagens de *Salmonella* Typhimurium em três diferentes concentrações (10^1 , 10^2 e 10^3 UFC), foram submetidas aos dois métodos propostos. Para o método A, as amostras diluídas (10^{-1}) em 225 mL de água peptonada tamponada foram fracionadas em 3 alíquotas de cada volume: 50mL, 5mL e 0,5mL. Para o método B, a amostra fortificada foi diluída, seriadamente, em água peptonada tamponada até 10^{-3} , sempre em triplicata. Todas as alíquotas, de ambos métodos, foram incubadas a 37°C por 18 horas. Após, alíquotas de cada um dos tubos foram semeadas em caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e incubadas à $42^{\circ}\text{C}/24$ h e após, em àgar Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4) à $37^{\circ}\text{C}/48$ h. Colônias suspeitas foram confirmadas por provas bioquímicas. O número de placas positivas para *Salmonella* sp. foi utilizado para o cálculo do NMP. Na segunda fase, os dois métodos foram avaliados em 20 amostras naturalmente contaminadas, mantidas congeladas por até 115 dias. Em 45 ensaios conduzidos para cada método, em amostras de lingüiça de carne suína contaminadas artificialmente, 38 do método A e 41 do método B resultaram em NMP (95% de intervalo de confiança) concordante com número de UFC de *Salmonella* inoculado. A variabilidade encontrada entre os valores de NMP médio foi bastante elevada, tanto entre os métodos como entre repetições de um mesmo método.

Entretanto, o método B foi o que demonstrou valores médios de NMP mais próximos das quantidades inoculadas, sendo portanto o mais adequado para analisar amostras de embutidos. As estimativas de NMP nas amostras contaminadas naturalmente demonstraram, valores baixos (até 10 NMP/g) na maioria das amostras analisadas. O congelamento das amostras pode ter determinado uma diminuição da contagem de *Salmonella* sp. nas amostras, pois, após os 90 dias de congelamento, todas as amostras analisadas apresentavam contagens <3 NMP/g.

Palavras-chave: *Salmonella* sp., quantificação, suíno, NMP

INTRODUÇÃO

A salmonelose tem sido uma das principais doenças transmitidas por alimentos de origem animal (2, 7, 11). Os surtos relatados, geralmente têm sido associados ao consumo de ovos e carne de frango, porém, nos últimos anos, o número de casos relacionados ao consumo de produtos de origem suína vem crescendo (6, 15, 16).

Estudos conduzidos no Sul do Brasil têm demonstrado a presença de *Salmonella* sp. em granjas de suínos (19, 22), em animais ao abate (5, 9) e no produto de origem suína após o processamento (9). A partir disso, torna-se importante avaliar o risco que produtos de origem suína possam representar ao consumidor. De acordo com as recomendações do Codex Alimentarius (10), uma avaliação de risco quantitativa tem como primeiro passo a identificação do perigo que, no caso de agentes bacterianos, passa pela estimativa da frequência e nível de contaminação do produto a ser avaliado. A detecção de *Salmonella* sp. é baseada em métodos qualitativos que não informam o número de microrganismos presentes no alimento (1, 12, 13) ou seja, não podem ser utilizados para estimar o nível de contaminação do produto.

A determinação do Número Mais Provável (NMP) é uma alternativa, baseada na probabilidade estatística, que tem sido empregada para a contagem de bactérias viáveis na água e nos alimentos (3, 21).

O fato do sucesso do isolamento de *Salmonella* sp. de alimentos depender de etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento em caldos seletivos, determina que a estimativa do NMP de *Salmonella* presente no alimento seja a abordagem mais adequada.

Alguns autores (12,13) utilizaram métodos, baseados na técnica de determinação do NMP, para a quantificação de *Salmonella* sp. em produtos de origem animal. Em ambos os casos, porém, os métodos foram empregadas diretamente em produtos cujo nível de contaminação era desconhecido, não permitindo uma avaliação do desempenho da mesma. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi comparar o desempenho dos dois métodos de quantificação de *Salmonella* sp., propostas anteriormente, em amostras de lingüiça de carne suína contaminadas artificialmente para determinar o método com melhor aplicabilidade para esse produto. Posteriormente, as metodologias foram avaliadas frente a amostras naturalmente contaminadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras contaminadas artificialmente

As amostras de lingüiça de carne suína utilizadas para os ensaios de contaminação artificial foram provenientes de produtos inspecionados, embalados, com peso aproximado de 250 g, de uma mesma marca, dentro do período de validade, mantidos em condições de refrigeração adequadas, adquiridos em estabelecimento comercial de Porto Alegre. Primeiramente, os produtos adquiridos foram avaliados quanto à presença de *Salmonella* sp., conforme método de isolamento testado

anteriormente (20), sendo utilizados para o estudo produtos com ausência de *Salmonella* sp.

Porções de embutido desses lotes foram assepticamente coletadas, homogeneizadas e, posteriormente, divididas em porções de 25g. Para a contaminação artificial foram utilizadas três diferentes linhagens de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028 e duas linhagens isoladas de produtos de origem suína), em três diferentes concentrações (10^1 , 10^2 , 10^3 UFC). Foram realizadas cinco repetições dos ensaios de contaminação artificial, sendo cada repetição analisada como uma amostra individual.

As amostras fortificadas, ou seja, aquelas contaminadas com *Salmonella* sp. em determinada concentração, foram acrescidas à 225 mL de água peptonada tamponada 1% e homogeneizadas. A seguir, foram retiradas três alíquotas de cada um dos volumes (50 mL, 5 mL e 0,5 mL) para a realização do método A (12). Nas alíquotas de 0,5 mL foram acrescidos 5 mL de água peptonada 1% para propiciar um volume mínimo de meio de cultura que permitisse o crescimento bacteriano.

Para o método B (13), foram retiradas 3 alíquotas de 10 mL (10^{-1}) e mais 3 alíquotas de 1 mL para diluição seriada em 9 mL de água peptonada tamponada 1% (10^{-2} e 10^{-3}), sempre em triplicata (Figura 2).

Todas as alíquotas (método A e B) foram incubadas a 37°C por 18 horas. Após o pré-enriquecimento, alíquotas de 0,1mL foram inoculadas em caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Merck) e incubadas a 42°C. Após 24 horas, foram retiradas alíquotas de cada tubo e semeadas em ágar Xylose-Lysine-Tergitol 4 ágar (XLT4, Difco). Colônias típicas de *Salmonella* sp. (5 colônias/placa) foram confirmadas através de perfil bioquímico e aglutinação com soro anti-O (Probac), conforme descrito anteriormente (18). O número de placas positivas para *Salmonella* sp. no ágar XLT4 foi utilizado para o cálculo do Número mais Provável (NMP) (3).

Para o controle do método foi realizada a inoculação da linhagem de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) em 225 mL de água peptonada tamponada 1% em concentração final de 10^1 , 10^2 , 10^3 UFC, na ausência de embutido, sendo posteriormente retiradas alíquotas para ambos métodos como descrito anteriormente.

Amostras naturalmente contaminadas

Foram coletadas 30 amostras de massa de embutidos de carne suína, em frigorífico no estado do Rio Grande do Sul. No primeiro momento, as amostras foram avaliadas qualitativamente quanto à presença de *Salmonella* sp. (20). Após a retirada das alíquotas para análise microbiológica, as amostras foram mantidas a -20°C . Amostras positivas para *Salmonella* sp. foram escolhidas aleatoriamente, após congelamento por período entre 12 e 115 dias, e submetidas aos dois métodos de quantificação anteriormente descritas. Para tanto, porções de 25 g foram suspendidas em 225 mL de água peptonada tamponada a 1%, homogeneizadas, sendo a seguir retiradas as alíquotas necessárias para a realização dos Métodos A e B.

Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo Teste Exato de Fisher, com nível de significância $P < 0,05$ e por Análise de Correlação (17).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 45 ensaios conduzidos, para cada método, em amostras de lingüiça de carne suína contaminadas artificialmente, 38 do método A e 41 do método B resultaram em NMP (95% de intervalo de confiança) concordante com número de UFC de

Salmonella inoculado (Tabela 1). Comparando os valores máximos e mínimos de NMP encontrados (3) nas amostras testadas, não houve diferença significativa ($p=0,5216$) na concordância obtida pelos dois métodos em relação à quantidade de *Salmonella* sp. inoculada. Entretanto, deve ser considerado que em 95% de intervalo de confiança, os valores mínimos e máximos admissíveis estão bastante distantes entre si. Desta forma, apesar da variabilidade encontrada entre os valores de NMP médio ter sido bastante elevada, tanto entre os métodos como entre repetições de um mesmo método (Figura 1), os valores para o NMP 95% estiveram de acordo com as quantidades inoculadas nas porções de embutidos (Tabela 1). Ao lado disso, quando os métodos foram correlacionados em relação ao NMP médio, houve baixa correlação entre os dois métodos, tanto para o nível de inoculação 10 UFC $r=0.2$ quanto para os demais níveis de inoculação testados $r=0.32$.

Das 30 amostras de massa de embutido coletadas no frigorífico, 28 (93,3%) foram positivas para *Salmonella* sp. Em 20 destas amostras naturalmente positivas para *Salmonella* determinou-se o NMP, após diferentes períodos de congelamento. Observou-se que as estimativas obtidas pelo Método A foram na maioria das vezes superiores às obtidas pelo Método B (Tabela 2). Na maioria (75%) das amostras analisadas pelo Método B até os 90 dias de congelamento determinou-se NMP <3. Este valor corresponde à ausência de crescimento em todas as repetições das três diluições analisadas, indicando que não houve recuperação da bactéria nos volumes semeados. Entretanto, ao analisar a mesma amostra pelo Método A, foi possível recuperar a bactéria em pelo menos uma das alíquotas analisadas. Após os 90 dias de congelamento todas as amostras ($n= 8$) resultaram em NMP<3, podendo significar que houve a diminuição das contagens de *Salmonella* sp. até níveis não mais detectáveis pelo método de estimativa de NMP.

Em estudos prévios, os métodos testados haviam sido consideradas adequadas para a quantificação de *Salmonella* (12, 13). Em ambos os casos, os métodos haviam sido aplicados em produtos naturalmente contaminados, cujo nível real de contaminação era desconhecido. A partir disso, foram utilizados parâmetros comparativos para os resultados obtidos no NMP. No primeiro caso (12) os resultados do NMP obtidos em lavados de carcaça de frango foram comparados com a contagem direta, em ágar Verde Brilhante, do número de unidades formadoras de colônia de *Salmonella* sp. presente em 10cm² de pele de frango. Nesse caso, o crescimento excessivo de microrganismos interferentes, associado ao baixo nível de contaminação das carcaças, dificultou a contagem direta de *Salmonella* sp. Em outro estudo (13), os dados obtidos para amostras de carne suína foram comparados com a contagem de mesófilos totais obtidas nas mesmas amostras, não tendo sido encontrada correlação entre ambos os parâmetros.

Ainda em outro estudo (23), amostras de carne suína moída foram avaliadas quanto ao NMP de *Salmonella* presente, em dois laboratórios diferentes. Os níveis encontrados pelos dois laboratórios, utilizando o mesmo método para estimar o NMP também teve baixa concordância, apresentando um índice de correlação $r=0,23$. Entre os fatores apontados para essa baixa concordância está o baixo nível de contaminação encontrado e o fato de que a distribuição de microrganismos é heterogênea em alimentos sólidos, como é o caso da carne moída.

No presente estudo tentou-se evitar a interferência da distribuição heterogênea do microrganismo, através da retirada de alíquotas, para ambos os métodos ,a partir da diluição inicial de uma mesma porção de alimento, artificialmente ou naturalmente contaminada. Entretanto, os volumes processados nos dois métodos são bastante diferentes sendo que este fator não pode ser alterado e pode ter interferido no

desempenho das mesmas. O Método A, que havia sido previamente empregado para lavados de carcaça de frango, trabalha com alíquotas de volumes com maior diferença entre si (50, 5 e 0,5 mL). Já o Método B, aplicado anteriormente em alimentos sólidos (carne suína crua), processa volumes iguais de diluições seriadas decimais sendo, talvez, mais adequado para essa situação onde a homogeneização da amostra é um obstáculo para a estimativa do NMP. Entretanto, ao analisar as amostras naturalmente contaminadas, a maioria das estimativas do Método B resultou em NMP <3, o que significa a ausência de crescimento em todas as alíquotas semeadas. Considerando que o volume da alíquota inicial proposto nesse método é de 10 mL, enquanto no Método B é de 50 mL, pode ocorrer que em baixas contagens de *Salmonella* no produto, haja detecção da bactéria em volume de 50 mL, não sendo possível em volume de 10 mL. Ou seja, no Método A avalia-se a probabilidade de encontrar a bactéria em diferentes volumes da diluição 10^{-1} , enquanto no Método B avalia-se a probabilidade de encontrar a bactéria em diluições decimais progressivas de mesmo volume. Entretanto, apesar da discrepância dos valores médios de NMP obtidos em ambos os métodos, os valores máximo e mínimo tiveram correspondência em todos os resultados obtidos.

Recentemente, foi lançado no Brasil um Programa de Monitoramento de Carcaças de Frango (8) que propõem a pesquisa e contagem de *Salmonella* sp. presente em lavados de carcaças de frango congeladas. O método de quantificação proposta prevê a diluição de 50 mL de lavado de carcaças em 450 mL de tampão de Butterfield e, a partir daí, diluições seriadas de 10 mL em 90 mL até 10^{-3} . A seguir, alíquotas de 1 mL do caldo de enxaguadura, bem como 1 mL das diluições seriadas são semeadas em água peptonada tamponada 1%. Ao lado disso, alíquotas de 10 mL do caldo de enxaguadura também são analisadas. A partir desse procedimento inicial, são conduzidas as etapas de pré-enriquecimento, subcultura em caldo seletivo e isolamento em meio sólido. Nesse

caso, apesar de usar volumes de amostra maiores, mantém-se o princípio de análise da probabilidade de isolamento de *Salmonella* em diluições decimais crescentes da alíquota inicial.

O alto índice de amostras de massa de embutido positivas para *Salmonella* estão de acordo com resultados anteriores verificados no mesmo abatedouro (5, 9). Índices elevados de contaminação por *Salmonella* sp. em embutidos também têm sido verificados em outros países. Na Alemanha, foi observado presença de *Salmonella* sp. em 75,3% de amostras de carne suína moída (23), enquanto no México 88,3% dos embutidos analisados eram positivos (13).

As baixas estimativas de NMP encontradas em produtos com presença de *Salmonella* sp. também estão de acordo com os dados relatados anteriormente, utilizando qualquer um dos métodos. Analisando carcaças de frango (12), 68% tinham menos de 10 NMP de *Salmonella* por grama. Já Sinell et al (23) encontraram níveis de até 100 NMP/g em 89% das amostras positivas de carne suína. Esses resultados indicam que, apesar da elevada ocorrência de *Salmonella* nesses produtos, os níveis de contaminação parecem ser baixos.

O congelamento das amostras de embutidos, provavelmente reduziu o número de células viáveis do microrganismo correspondendo a um menor número de células detectáveis (23), principalmente após 90 dias de congelamento. Esse fato pode estar ligado ao estresse resultante da conservação à baixa temperatura, criando dificuldade de recuperação da bactéria. Apesar das baixas temperaturas não serem um método de eliminação de bactérias, estudos anteriores (4, 14) observaram uma redução progressiva na contagem de *Salmonella* Typhimurium presentes em amostras de alimentos congeladas.

A partir dos dados obtidos, conclui-se que o Método B (13) teve os resultados mais próximos das contagens presentes em amostras contaminadas artificialmente. Considerando a baixa contagem usualmente encontrada nos embutidos de carne suína, a utilização de alíquotas maiores, equivalentes á 1 g e 10 g de produto podem contribuir para a melhor determinação dos resultados.

REFERÊNCIAS

1. Bager, F.; Petersen, J. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. *Acta Vet. Scand.*, 32: 473-481, 1991.
2. Baggensen, D.L.; Sorensen, L.L.; Krause, P.; Gerner-Smidt, P. *The occurrence of Salmonella enteric serotypes in animal feed, pig, pork and man*. II International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Copenhagen, 1997, p. 56-59.
3. BAM. Bacteriological Analytical Manual. Online. Appendix 2: Most Probable Number Determination from Serial Dilutions. Ed. 8, revision A/1998.
4. Barrel, R. A.E. The survival and recovery of *Salmonella* Typhimurium phage type U285 in frozen meats and tryptone soya yeast extract broth. *Int. J. Food Microbiol.* , 6: 309-316, 1988.
5. Bessa, M. C; Costa, M.; Cardoso, M.. Prevalência de *Salmonella* sp. em frigorífico do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.24, p. 80-84, abril/junho, 2004.
6. Blaser, M.J. ; Newman, L.S. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Ver. Infect. Dis.*, 4: 1096–1106, 1982.

7. Borch, E.; Nesbakken, T.; Christensen, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int.J.Food Microbiol.*, 30: 9-25, 1996.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa ,n^o. 70, 06/10/2003, que instituiu o Programa de Redução de Patógenos-Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em carcaças de Frangos e Perus.
9. Castagna, S.M.F. et al. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos frescal. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 32 (2), 2004.
10. Codex Alimentarius. Código internacional: recomendações das práticas para a elaboração e manipulação dos alimentos. Disponível na internet:
<<http://www.codexalimentarius.net/>
11. Costalunga S.; Tondo, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brasil, 1997 to 1999. *Braz. J. Microbiol.* , 33: 342-346.
12. Dufrenne, J.; Ritmeester, V.; Van Asch, E.D.; Van Leusden, F.; de Jonge, R. Quantification of the Contamination of Chicken and Chicken Products in the Netherlands whit *Salmonella* and *Campylobacter*. *J. Food Protection.* , 64: 538-541, 2001.
13. Escartín, E.F.; Lozano, J. S. ; Rodriguez, O; Gonzales, N. M. ; Torres, J. A. Incidence and level of *Salmonella* serovars raw pork obtained from Mexican butcher shops. *Food Microbiol.*, 12: 435-439, 1995.
14. Escartín, E.F.; Lozano, J.S.; Garcia, R. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *Int. J. Food Microbiol.* , 54: 19-25, 2000.
15. Fedorka-Cray, P.J. The connection between *Salmonella*, swine, and food safety. In: Swine Conference, Nebraska, 1996. P. 25-45.

16. Galton, M. M.; Lowery, W. D.; Hardy, A.V. *Salmonella* in fresh and smoked pork sausage. *J. of Infectious Diseases*. 95: 232-235, 1954.
17. Graphpad InStat. Versão 2,01, São Paulo: Graphpad Software, 1990-1993.
18. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.; Stanley, J.T.; Williams, S.T. (Eds). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, 1994, p. 186-187.
19. Kich, J. D.; Mores, N.; Vidal, C.E. Piffer, I.; Barioni Júnior, W.; Amaral, A.; Ramminger, L.; Cardoso, M.I. Fatores associados com a prevalência sorológica de *Salmonella* sp. em granjas comerciais do sul do Brasil. X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em suínos, 10., 2001, Porto Alegre. Anais...Porto Alegre: ABRAVES, 2001. v.2, p. 115-116.
20. Michael, G.B. ; Simoneti R. ; Costa M. ; Cardoso M. Comparison of different selective enrichment steps to isolate salmonella sp. from feces of finishing swine. *J. Of Microbiol.* 34 : 138-142, 2003.
21. Peeler, J. T. , Houghtby, G. A. ,Rainosek, A. P. 1993 The most probable technique. In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3 rd ednpp 105-120. Washington, D.C., American Public Health Association.
22. Silva, L.E.; Gotardi, C.P.; Mostardeiro, P.; Santin, K.; Vizzotto, R; Kich, J. D.; Nadvorni, A ;Cardoso, M.R.I.. Estudo Longitudinal da infecção por *Salmonella* sp. em um sistema integrado de Produção de Suínos. XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em suínos, 11, 2003, Goiânia. Anais...Goiânia: ABRAVES, 2003. v.2, p. 61-62.
23. Sinell, H.J. ; Pietzsch, O.;Klingbell, H. ; Benner, M. Estimation of most probable number of *Salmonella* in retail samples of miced pork. *Int. J. Food Microbiol.* , 11: 135-142, 1990.

Tabela 1 – Número mais Provável de *Salmonella* estimado por dois métodos (A e B) em amostras de embutido de carne suína inoculadas artificialmente com 10, 100 e 1000 unidades formadoras de colônia de *Salmonella* Typhimurium.

NMP (95%) de <i>Salmonella</i>	Quantidade de <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculada					
	10 ufc		100 ufc		1000 ufc	
	A	B	A	B	A	B
1-9,9	6	11				
10-99	9	4	5	8		1
100-999			4	7	1	4
1000-1100			4		3	7
>1100			2		11	3

Tabela 2 – Número mais Provável de *Salmonella* sp. estimado em amostras de massa de embutido de carne suína naturalmente contaminadas, mantidas congeladas, utilizando dois métodos diferentes (A e B).

Amostra	Dias de congelamento	Valor de NMP/g estimado	
		Método A	Método B
1	12	<3	<3
2	12	9,2	<3
3	12	11	<3
4	12	9,2	<3
5	14	15	9,2
6	14	<3	<3
7	14	28	15
8	14	3,6	<3
9	90	1.100	240
10	90	<3	<3
11	90	93	9,2
12	90	<3	<3
13	90	<3	<3
14	90	<3	<3
15	90	<3	<3
16	90	<3	<3
17	90	<3	<3
18	90	<3	<3
19	90	<3	<3
20	90	<3	<3

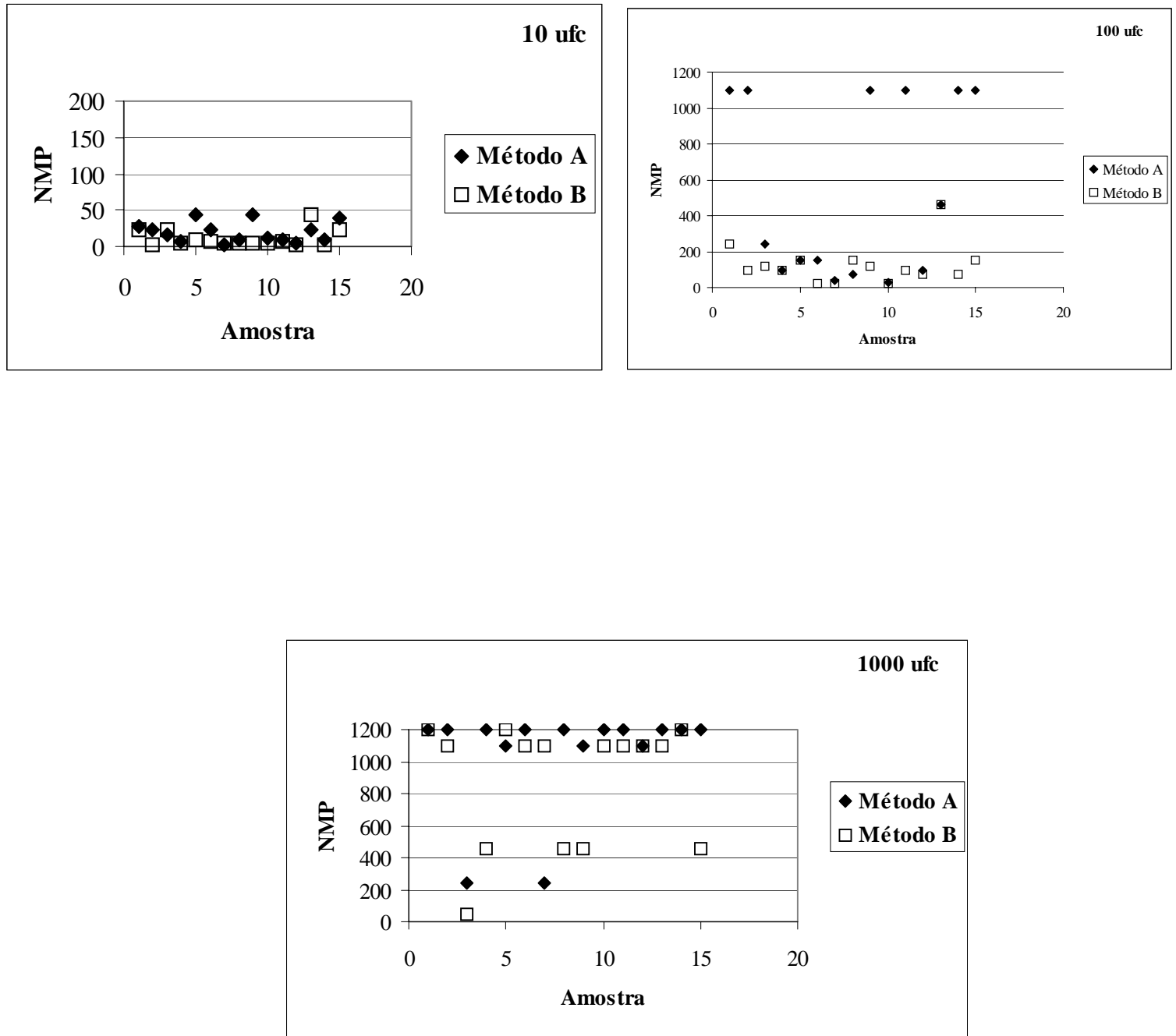


Figura 1 – Número Mais Provável Médio de *Salmonella* estimado por dois métodos (A e B) em amostras de embutidos de carne suína inoculadas com 10, 100 e 1000 unidades formadoras de colônia (ufc) de *Salmonella* Typhimurium.

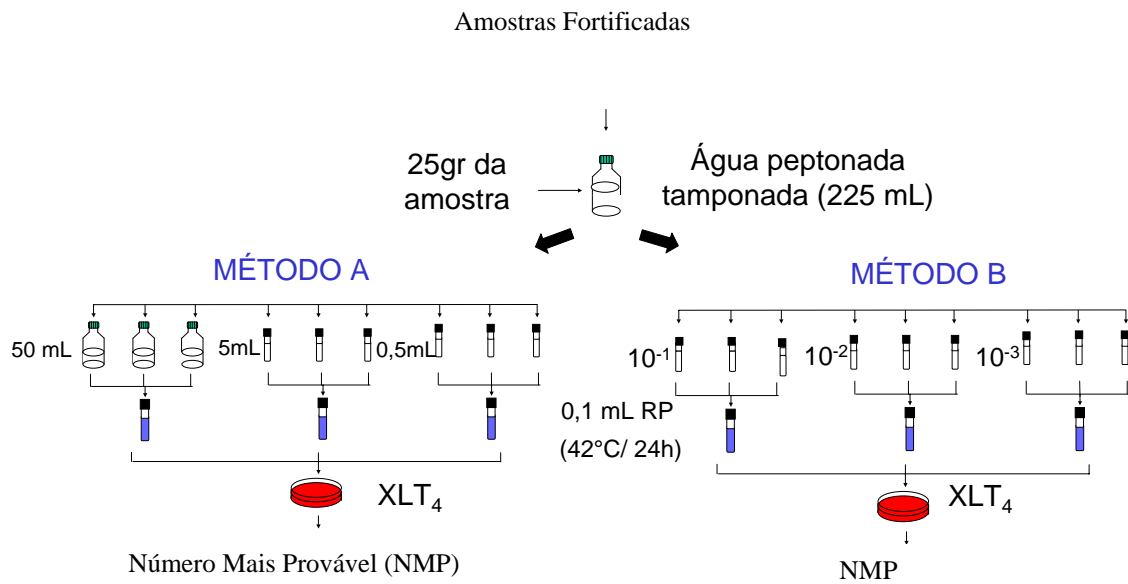


Figura 2. Organograma dos esquemas das metodologias de quantificação de *Salmonella* sp. comparadas. Método A, adaptado de Dufrenne et al; Método B de acordo com Escartin et al.

3 DISCUSSÃO GERAL

A segurança dos alimentos é um ponto de definição no mercado global de produtos suínos, sendo que a *Salmonella* sp. vem se tornando uma preocupação crescente para a indústria suinícola mundial (DAVIES, P., 1997).

Esse aspecto é de grande importância quando considera-se a afirmação de Blaha, T. (1996), que aponta o crescente risco de surtos de salmonelose em humanos veiculados por produtos suínos, principalmente aqueles que não sofrem um tratamento térmico durante o processo de fabricação.

Embutidos tipos frescal, como a lingüiça, podem ser um exemplo do grupo que oferece maior risco ao consumidor. Ao lado disso, na fabricação dos embutidos são utilizadas porções de carcaças provenientes de diferentes lotes abatidos num mesmo dia, além de haver grande manipulação da matéria-prima até o produto estar finalizado. Esses fatores, sem dúvida, contribuem no aumento do risco de contaminação do produto final. A exemplo disso, Berends, B.R. et al. (1998) estimaram a ocorrência de *Salmonella* sp. em 5 a 40% dos cortes suínos processados na Holanda, enquanto em embutidos esse índice chegou a 70%.

A competição em novos mercados e o aumento do nível de exigência dos consumidores no mercado interno pressupõem a busca constante de qualidade dos alimentos. Dentro do conceito de qualidade, o aspecto sanitário tem importância fundamental e é uma barreira para a comercialização dos produtos no âmbito internacional.

Como forma a dar resposta a este desafio, estão sendo aplicadas estratégias para garantir a segurança dos alimentos consumidos, "desde a produção agrícola até à mesa".

Com as mudanças nas técnicas de processamento e distribuição de alimentos, é preciso desenvolver tecnologias apropriadas que possam ser multiplicadas e rapidamente disseminadas, com isso, estão surgiram novas formas de avaliação de riscos na produção de alimentos seguros (FORSYTHE, S.J., 2001).

Vários fatores estão envolvidos, desde a produção do alimento até a saúde do consumidor. Considerando a interação desses fatores, criou-se a análise de risco. Esses fatores incluem: I. a identificação dos perigos, que podem ser químicos, físicos ou microbiológicos; II. avaliação da exposição, ou seja, a quantidade do produto que foi ingerido; III. a caracterização do perigo, a qual fornece uma estimativa da natureza,

gravidade e duração dos efeitos causados pelos agentes presentes nos alimentos; IV. a caracterização de risco, que estima os efeitos adversos de ocorrência provável em uma dada população.

Weiss, L.H.N. et al. (1999) relataram, pela primeira vez no Rio Grande do Sul, o isolamento de *Salmonella* sp. em suínos sem sintomas clínicos, tanto na granja como ao abate. Bessa, M. C; Costa, M.; Cardoso, M. (2004) encontraram uma prevalência, ao abate, de 55,5% de suínos positivos para *Salmonella* sp. em linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal. Castagna, S.M.F. et al. (2004b) demonstraram que a prevalência de suínos portadores ao abate estava correlacionado com a presença de *Salmonella* sp. na massa de embutidos fabricado a partir de porções de carcaça desses animais. Nesse mesmo estudo, 93,94% das amostras de massa para embutimento produzidas eram positivas para *Salmonella* sp., indicando um provável risco para o consumidor.

Entretanto, analisando os alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos, entre 1999 e 2000, no Rio Grande do Sul, é possível constatar que apenas poucos casos (4/75) estiveram relacionados a produtos de origem suína (GEIMBA, M.P. et al., 2004).

Vários fatores podem estar contribuindo para esses dados conflitantes. Em primeiro lugar, o baixo número de *Salmonella* sp. que supõem-se esteja presente na massa de embutimento, de acordo com resultados preliminares, encontrados no presente estudo e por Castagna S.M.F et al (2004b). Ao lado disto, uma possível diminuição da população de *Salmonella* sp. durante o período de estocagem, eventualmente por um efeito tóxico de substâncias conservantes presentes no embutido e da temperatura de refrigeração. Ainda, o fato que os produtos de origem suína costumam ser tratados termicamente, por um tempo prolongado, antes do consumo. Finalmente, deve-se ainda considerar que, culturalmente em nossa população, o receio de consumir produtos de origem suína conservados e cozidos inadequadamente está presente.

Todos esses fatores devem ser ainda estudados para que se possa avaliar o risco que produtos de origem suína oferecem para a ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na população.

A partir disso, a contribuição do presente estudo foi buscar estabelecer um método confiável de quantificação de *Salmonella* sp. em produtos suínos, uma vez que uma das etapas da análise de risco prevê a quantificação do perigo.

O fato de etapas de enriquecimento seletivo serem indispensáveis para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de alimentos, torna os métodos de contagem em placa pouco apropriados, sendo preciso adotar métodos de estimativa de Número Mais Provável (NMP). Os estudos disponíveis na literatura (DUFRENNE, J. et al., 2001; ESCARTIN E.F., 1990), por sua vez, haviam aplicado diferentes protocolos de determinação de NMP apenas a alimentos naturalmente contaminados. Desta forma, os resultados não tinham um parâmetro de comparação que permitisse avaliar o desempenho dos protocolos. A partir disso, o presente estudo buscou comparar os dois protocolos, avaliando amostras contaminadas artificialmente com uma quantidade conhecida de *Salmonella* sp. Em 45 ensaios conduzidos, para cada método, 38 do método A (DUFRENE J. et al., 2001) e 41 do método B (ESCARTIN E.F. et al., 1990) resultaram em NMP (95% de intervalo de confiança) concordante com o número de unidades formadoras de colônia de *Salmonella* sp. inoculado. A variabilidade encontrada entre os valores de NMP médio foi bastante elevada, tanto entre métodos como entre as repetições do mesmo método. Isto reflete uma das limitações do método de NMP para estimar a contagem de microrganismos e deverá ser considerada, quando o método for aplicado em alimentos naturalmente contaminados. Uma vez que o método B (ESCARTIN E.F. et al., 1990) foi o que demonstrou valores médios de NMP mais próximos das quantidades inoculadas, sugere-se que este seja adotado em estudos futuros de quantificação de *Salmonella* sp. em produtos de origem suína.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no estudo desta dissertação, concluíram-se os seguintes pontos:

- 1- A variabilidade encontrada entre os valores médios de NMP foi bastante elevada.
- 2- O método B apresentou valores médios de NMP mais próximos da quantidade inoculada, sendo, portanto, o mais adequado para análise de amostras de embutido.
- 3- As estimativas de NMP em amostras naturalmente contaminadas demonstrou valores baixos (até 10 NMP/g) na maioria das amostras.
- 4- O congelamento das amostras pode ter determinado uma baixa na contagem de *Salmonella* sp. nas amostras (<3NMP/g).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. C. et al.. *Salmonella* sp em linfonodos de suínos normais abatidos no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 16, n. 4, p.172-176, 1994.

ATLAS, R. M. **Principles of microbiology**. 2nd ed. USA: Smith, 1997. 1298p.

BAGER, F.; PETERSEN, J. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. **Acta Veterinarie Scandinavica**, v. 32, p. 473 – 481, 1991.

BANWART, J. **Basic food microbiology**. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 773p.

BARCELLOS, D. E. S. N. et al. Ocorrência da salmonelose septicêmica em suínos no período neonatal. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1., 1984, Curitiba. Anais...Curitiba: ABRAVES, 1984. p. 29.

BELLO-PÉREZ, L. A. Serotipos de *Salmonella* identificados en chorizos que se expenden en Acapulco, Guerrero, México. **Revista Latino-Americana de Microbiologia**, n. 35, p. 377-381, 1993.

BERENDS, B. R. ; URLINGS, H. A. P. ; SNIJDERS J. M. A. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* sp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 37-53. 1996.

BERENDS, B.R; et al. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **International Journal Food Microbiology**, v.36, p.199-206, 1997.

BESSA, M. C; COSTA, M.; CARDOSO, M.. Prevalência de *Salmonella* sp. em frigorífico do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.24, p. 80-84, abr./jun., 2004.

BLAHA, T. The impact of *Salmonella* on the swine industry. In: SWINE CONFERENCE, 1996, Nebraska. **Proceedings...**Nebraska, 1996. p. 1-20.

BLASER, M.J. AND NEWMAN, L.S. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. **Journal of Infectious Diseases**, v.4, p. 1096–1106, 1982.

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

BPL agra (brilliant-green phenol-red lactose agar to kauffman). In: **MICROBIOLOGY manual Merck**. Darmstadt. Merck, 1996. p.63.

BUCHANAN, R.L, DEROEVER, C.M. Limits in assessing microbiological food safety. **Journal of Food Protection**. V.56, p.725- 729, 1993.

BUCHANAN, R.L. Acquisition of microbiological data to enhance food safety. **Journal of Food Protection**. v. 63, n.6, p.832-838, 2000.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R. et al., **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 229 – 238.

CASTAGNA, S.M.F. et al. Presence of *Salmonella* sp. in the intestinal tract and tonsils/mandibular lymph nodes in pigs at slaughter. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**,v. 56, n.3, p.300-306, June 2004a

CASTAGNA, S.M.F. et al. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n.2, p. 2004b.

CHAVES, G.M.C. et al. Avaliação bacteriológica de lingüiça frescal suína comercializada no Município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.73, p.48-52, 2000.

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

D'AOUST, J.Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 17-40, 1991.

DAVIES, P. Food safety and its impact on domestic and export markets. **Swine Health and Production**, v.5, p.13-20, 1997.

DAVIES, R.H.; WRAY, C. Evaluation of rapid cultural method for identification of salmonellas in naturally contaminated veterinary samples. **Journal Application Bacteriology**, Oxford, v. 77, p. 237-241, 1994

DUFRENNE, J et al. Quantification of the Contamination of Chicken and Chicken Products in the Netherlands whit *Salmonella* and *Campylobacter*. **Journal Food Protection**, v.64, p. 538-541, 2001.

ESCARTIN, E.F. et al. Incidence and level of *Salmonella* serovars in raw pork obtained from Mexican butcher shops. **Food Microbiology**, v. 12, p. 435-439, 1995.

ESCARTÍN, E.F. et al. Prevalence of *Salmonella* in churizo and its survival under different storage temperatures. **Food Microbiology**, v.16, p.479-486, 1999.

ESCARTÍN, E.F.; LOZANO, J.S.; GARCIA, O.R. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. **International Journal Food Microbiology**, v. 54, p. 19-25, 2000.

FEDORKA-CRAY, P.J. The connection between *Salmonella*, swine, and food safety. In: SWINE CONFERENCE, 1996, Nebraska. **Proceedings...Nebraska**, 1996. p. 25-45.

FIALHO, E.T. et al. Análise proximal e ocorrência de Salmonelas em alimentos e concentrados protéicos utilizados em rações de suínos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, 1985.p. 1-4. (Comunicado Técnico, n. 87)

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia de segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

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

GALTON, M. M.; LOWERY, W. D.; HARDY, A.V. *Salmonella* in fresh and smoked pork sausage. **Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 232-235, 1954.

GEIMBA M.P. et al. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal Food Protection**, v.67, n.6, p.1229-1233, June 2004.

GIBSON, E.A. *Salmonella* infection in pigs. **The British Veterinary Journal**, London, v.125, n.9, p.431-436, 1969.

GIROTTO, A. F. Análise e Perspectivas da Suinocultura Brasileira. **Embrapa Aves e Suínos**, 2004. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/?/artigos/2001/artigo-2001-n011.html;ano=2001>. Acesso 20 set 2004.

GRAPHPAD INSTAT. Versão 2,01. São Paulo: Graphpad Software, 1990-1993. 1 CR-ROM.

HAACK, O. N.; VARGAS, C. R.; STIFELMANN, R. **Produção de embutidos cozidos**. Porto Alegre: UFRGS, ICTA, 1987. 56p.

HAACK, O. N.; BERNARDI, R.; RIVERO, M. **Embutidos crus**. Porto Alegre: UFRGS, ICTA, 1991. 39p.

HALD, T.; WEGENER, H. C. Quantitative assesment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings...Washington**, 1999. p. 200-205.

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

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Williams & Wilkins, 1994, 797p.

HOORNSTRA, E. ; NOTERMANS S. Quantitative microbiological risk assessment. **Journal of Food Microbiology**, v. 66. p. 21-29, 2001.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.

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

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. The alimentary sistem. In: _____. **Pathology of domestic animals**. 3rd ed. Academic Press, 1985. v.2, cap.1, p.135-143.

LATIMER, H.K. et al. A weighted composite dose–response model for human salmonellosis. **Risk Analise**, v.21 ,p.295–305, 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.

LOBO, M.V. et al. Avaliação microbiológica de salames coloniais comercializados no município de Santa Maria-RS. **Higiene Alimentar**, v.15, n.88, p.57-61, 2001.

MARTINS, J. F.; TERRA, N. N. **Curso sobre biotecnologia do processamento de salames e outros embutidos curados**. Santa Maria: UFSM, 1985. 94p.

MICHAEL, G.B. et al. Comparison of different selective enrichment steps to isolate salmonella sp. from feces of finishing swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 138-142, May, 2003.

MOO, D. et al. The isolation of *Salmonella* from jejunal and caecal lymph nodes of slaughtered animals. **Australian Veterinary Journal**, Melbourne, v.56, p.181-183, Apr. 1980.

MÜLLER kauffmann tetrionate broth. *Int. J. Food Microbiology*., Amsterdam, v.5., p.237-239, 1987.

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., 4., 1994, Porto Alegre. **Anais**. [S.l.:s.n.], [1994 ?].

NOTERMANS, S. ; TEUNIS P. Quantitative risk analysis and the production of microbiologically safe food: an introduction. **Journal of Food Microbiology**, v. 30, p.3-7. 1996.

OLIVEIRA, G. **Avaliação de pontos críticos de contaminação por *Salmonella* sp. no processo da fabricação da farinha de vísceras, destinada à fabrica de rações para aves.** 1996. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)– Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

OSCAR, T.P. A quantitative risk assessment model for Salmonella and whole chickens. **International Journal Food Microbiology** v. 93, p. 231-247, 2004.

OYEKOLE, O. D.; HASSAN, J. O. A survey of the bacteriological status of fresh and baked pork sausages produced in Ibadan, Nigeria. **International Journal Zoonoses**, v. 11, n. 2, p. 127-132, 1984.

PARDI, M. C. **Ciência, higiene e tecnologia da carne.** Niterói: EDUFF, 1993. v.2.

PEELER, J. T. ; HOUGHTBY, G. A. ;ANDRAINOSSEK, A. P. The most probable technique. In: Vanderzant, C. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3 rd .Washington, D.C. : American Public Health Association, 1997, pp. 105-120.

RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) broth. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.5, p.254-255, 1987.

ROBERTS, D. et al. The isolation of Salmonellas from British pork sausage meat. **Journal of Hygiene**, v. 75, p. 173-184, 1975.

ROSTAGNO, M.H. **Epidemiologia e diagnóstico das infecções por *Salmonella* sp. em suínos.** 2002. 56f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2002a

ROSTAGNO, M. H. *Salmonella* infection in market swine during pre-slaughter holding. In: IPVS CONGRESS. 17, 2002, Iowa. **Proceedings**. Iowa: IPVS, 2002b. p. 319.

SÃO PAULO (SP). Decreto nº 12342 de 27 setembro de 1978. Código sanitário de São Paulo, Imprensa **Oficial**, São Paulo, p. 376, 1978.

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

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

SHERROD, P.S.; AMAGUANA, R.M.; ANDREWS, W.H et al. Relative effectiveness of selective plating agars for recovery of *Salmonella* species from selected high-moisture foods. **Journal AOAC International**, v.78, n.3, p.679-690, 1995.

SINELL, H. J et.al. estimation of most probable number of salmonella in retail samples of minced pork. **Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 135-142. 1990.

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

SOJKA, W. J.; GITTER, M. Salmonellosis in pigs with reference to its public health significance. **Veterinary Reviews and Annotations**, v.7, p. 11-28, 1961.

STRAPAZZON, R. **Apostila técnica duas rodas para frigoríficos**. Jaraguá do Sul, SC Frigo Representações, 1997. 79p.

SWANENBURG, M. et al. Tonsils of slaughtered pigs as marker sample for *Salmonella* positive porke. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: 1999. p.264-265.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Introducion a la microbiologia**. 3.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.792 p.

VARNAM, A. S. *Salmonella*. In:_____. **Foodborne pathogens**. London: Wolfe Publishing, 1999, 462 p.

VASSILIADIS, P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview. **Journal Application Bacteriology**, Oxford, v. 54, p. 69-76, 1983.

WEISS, L.H.N. et al. Occurence of Salmonella in finishing pigs in south Brazil. In: INTERNASTIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 2., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [s.n], 1999. p.184-185.

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

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

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

XLT4 agar. In: MICROBIOLOGY manual Merck. Darmstadt: Merck, 1996. p. 302-303.

ZEBRAL, A. A; FREITAS, C. A; HOFER, E. Ocorrência de *Salmonella* em gânglios linfáticos de suínos aparentemente normais, abatidos no matadouro de Santa Cruz, cidade do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.72, n.3/4, p. 223-235, 1974.

APÊNDICE A

Número de colônias	Repetição	Amostra	Método A	Método B
10	1	A	+	+
100	1	A	-	+
1000	1	A	+	+
10	1	B	+	+
100	1	B	-	+
1000	1	B	+	+
10	1	C	+	+
100	1	C	+	+
1000	1	C	+	-
			7:9	8:9

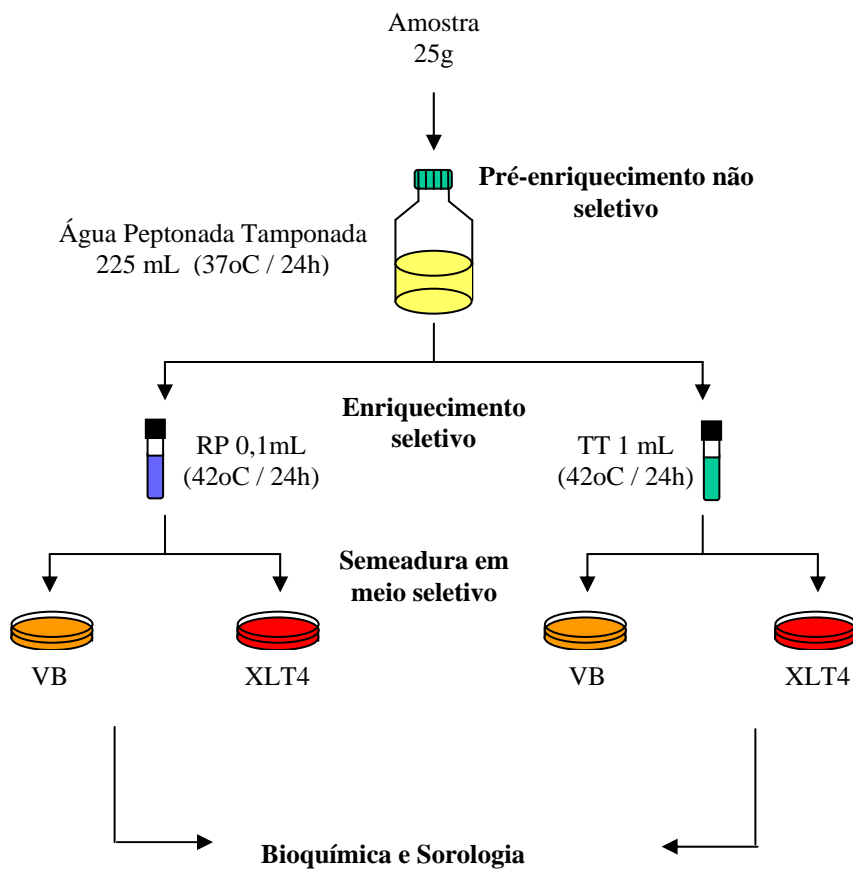
Número de colônias	Repetição	Amostra	Método A	Método B
10	2	A	+	+
100	2	A	+	+
1000	2	A	+	+
10	2	B	+	+
100	2	B	+	+
1000	2	B	+	+
10	2	C	+	+
100	2	C	+	-
1000	2	C	+	+
			9:9	8:9

Número de colônias	Repetição	Amostra	Método DUFRENNE	Método ESCARTIN
10	3	A	+	+
100	3	A	+	-
1000	3	A	+	+
10	3	B	+	+
100	3	B	+	+
1000	3	B	+	+
10	3	C	+	+
100	3	C	-	+
1000	3	C	+	+
			8:9	8:9

Número de colônias	Repetição	Amostra	Método A	Método B
10	4	A	+	+
100	4	A	-	-
1000	4	A	+	+
10	4	B	+	+
100	4	B	-	+
1000	4	B	+	+
10	4	C	+	+
100	4	C	+	+
1000	4	C	+	+
			7:9	8:9

Número de colônias	Repetição	Amostra	MétodoA	MétodoB
10	5	A	+	+
100	5	A	+	+
1000	5	A	+	+
10	5	B	+	+
100	5	B	-	+
1000	5	B	+	+
10	5	C	+	+
100	5	C	-	+
1000	5	C	+	+
			7:9	9:9

APÊNDICE B



ORGANOGRAMA DE PROCEDIMENTO PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SP.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA REALIZADA DURANTE O MESTRADO

A) Artigo publicado em revista indexada:

BOROWSKY, L.M., DRIEMEIR D., ROZZA D.B., CARDOSO, M.R.I. Mastite com septicemia em caninos causado por *Staphylococcus intermedius*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 111-113, 2003.

KICH J.D, **Borowsky, L.M.,** SILVA, v.s., RAMENZONI, MM., TRIQUES, N., KOOLER, F.L., CARDOSO M.R.I. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 1, p. 33-39, 2004.

B) Artigos publicados em eventos:

Completos:

KICH J.D, **BOROWSKY, L.M.,** SILVA, v.s., RAMENZONI, MM., TRIQUES, N., KOOLER, F.L., CARDOSO M.R.I. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. **Anais...**Goiânia:ABRAVES, 2003. v.2, p.65-66.

BOROWSKY, L.M., BELTRÃO N., SCHMIDT, V., CARDOSO, M. Comparison of two methodologies of Quantification of the *Salmonella* sp. In fresh pork. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 17, 2004, Buenos Aires. **Anais...**Buenos Aires, 2004. p-10-12.

Resumidos:

SCHWANTES V.C., CORREA, A.M.R., **BOROWSKY L.M.;** CARDOSO, M.I.R. DRIEMEIER D. Septicemia por streptococcus canis em cães golden retriever com hipoplasia de timo. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (UFRGS), 15., 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2003. p.235.

TORRES, C.A, **BOROWSKY, L.M.,** SANTOS M.A, CARDOSO, M.R.I., SCHMIDT V. caracterização de Sistema de tratamento de dejetos em unidades integradas de produção de suínos no município de Três Passos, RS. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (UFP), 12, 2004, Passo Fundo. **Anais...**Passo Fundo, 2004. Artigo 140.

BOROWSKY, L.M., SELLA, A.B., CARDOSO, M.I.R. Comparação de duas metodologias de quantificação de salmonella sp. em embutidos de carne suína. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 1, 2004, Gramado. **Anais...**Gramado, 2004, p-84.

ROZZA,D.B., CORREA, A.M.R., PESCADOR, C.A, **BOROWSKY,L.M.**, DRIEMEIER, D.In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA (UNESP), 11, 2004, Botucatu.**Anais....**Botucatu, 2004.P.109.

C) Artigos a ser submetidos à publicação em revista indexada:

BOROWSKY, L.M., SCHMIDT, V. CARDOSO, M.I.R.Comparação de dois métodos para estimativa do número mais provável de *salmonella* sp. em embutidos de carne suína. **Brazilian Journal.**

D) Demais tipos de produção técnica

BOROWSKY, L.M. Controle de vetores Biológicos. Palestra proferida na disciplina de Medicina Veterinária Preventiva, UFRGS, Porto Alegre – RS, 2003.

BOROWSKY, L.M. Tratamento de água no meio rural. Palestra proferida na disciplina de Medicina Veterinária Preventiva, UFRGS, Porto Alegre – RS, 2003.

BOROWSKY, L.M. Atividade de extensão universitária no laboratório de diagnóstico em Medicina Veterinária Preventiva /FAVET/ UFRGS, 2004.

BOROWSKY, L.M. Estágio realizado no Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Sassari- Italy, 2004.

BOROWSKY, L.M. Estágio docente em práticas de laboratório na disciplina de Medicina Veterinária Preventiva, UFRGS, Porto Alegre – RS, 2003.

BOROWSKY, L.M. *Saphylococcus intermedius* em mastite. Palestra proferida no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, UFRGS, Porto Alegre – RS, 2003.

BOROWSKY, L.M. Salmonella sp.em suínos. Palestra realizada na Semana Acadêmica da Veterinária , UFRGS, Porto Alegre-RS, 2004