

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

Avaliação de risco de infecção por *Salmonella* sp. em consumidores de lingüiça frescal
de carne suína em Porto Alegre, RS

Lisandra Mürmann

PORTO ALEGRE, 2008

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

Avaliação de risco de infecção por *Salmonella* sp. em consumidores de lingüiça frescal
de carne suína em Porto Alegre, RS

Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências
Veterinárias Especialidade na
área de Bacteriologia

Lisandra Mürmann*

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Co-Orientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Corbellini

PORTO ALEGRE, 2008

*Médica Veterinária Msc.

Lisandra Mürmann

Avaliação de risco de infecção por *Salmonella* sp. em consumidores de lingüiça frescal de carne suína em Porto Alegre, RS

Aprovada em 26 de fevereiro de 2008.

APROVADA POR

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

APROVADA POR

Profª. Dra. Verônica Schmidt
Membro da Comissão

APROVADA POR

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Membro da Comissão

APROVADA POR

Prof. Dr. Eduardo César Tondo
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me acompanha a todos os instantes, revigorando, fortalecendo e auxiliando a transpor todos os obstáculos.

À minha orientadora Profa. Dra. Marisa Cardoso, exemplo de muita competência e dignidade, que me proporcionou ensinamentos valiosos, os quais levarei para sempre.

Ao Prof. Dr. Luis Gustavo Corbellini, pela amizade e grande apoio estatístico.

À Profa. Dra. Verônica Schmidt pela amizade.

À Profa. Dra. Ana Paula Ravazzolo pela disponibilização do sistema de captura de imagem.

À Dra. Geovana Michael pela gentil disponibilização sempre que solicitada.

À Cecília pela amizade e dedicação.

À Dra. Marjo, pela amizade, disponibilidade e grande auxílio técnico desde o início, sempre sendo um grande exemplo de dedicação.

As grandes amigas que fiz no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, durante estes 4 anos. Levarei todos no coração!

Ao CNPq pelo auxílio financeiro que permitiu que este trabalho fosse realizado com dedicação integral.

Aos meus pais, Celso (in memoriam) e Nelsinda, que com muito amor transmitiram a mim educação, respeito e humildade e estão comigo em todos momentos. Devo tudo á vocês!!!

A minha irmã, Márcia, meu cunhado Eduardo e minha sobrinha Giovanna (nossa grande alegria!), por estarem sempre presentes.

Ao meu grande amor, Leandro, pela amizade, amor, apoio e por fazer parte de minha vida. Te amo!!!

RESUMO

O isolamento de *Salmonella enterica* em suínos abatidos tem sido reportado no sul do Brasil, o que torna a carne suína uma fonte potencial de contaminação para os consumidores. Nesse contexto, o trabalho propôs estimar o risco da ocorrência de infecção alimentar pelo consumo de lingüiça frescal suína, através da análise de dados de prevalência, quantificação, cinética de crescimento e destruição e de surtos alimentares que envolveram *Salmonella* no Rio Grande do Sul. Das 336 amostras de lingüiça frescal de carne suína adquiridas no comércio, 24,4% apresentaram *Salmonella* sp. com contagens variando entre 0,03 e 460 Número mais Provável (NMP).g⁻¹, com mediana de 0,23 NMP.g⁻¹. Os sorovares mais prevalentes foram Brandenburg, Derby, Panama e Typhimurium. Em simulações de crescimento e destruição realizadas em caldo nutriente, isolados dos 12 sorovares encontrados no produto, apresentaram cinética de crescimento semelhante em temperatura ambiente. Até duas horas todos os sorotipos permaneceram em fase lag e, após, iniciou-se a fase exponencial. Em temperatura de refrigeração, todos os isolados mantiveram a contagem inicial até 30 dias. A destruição térmica em 60°C ocorreu após 20 minutos em todos os ensaios. As mesmas simulações foram conduzidas em amostras do produto contaminadas artificialmente com *Salmonella* sp. não havendo alterações significativas nas quantidades de *Salmonella* em temperatura ambiente e de refrigeração durante todo o período de observação. Após a preparação em forno (200°C), por 15 minutos, a população total inoculada foi destruída. Nos surtos ocorridos por *Salmonella*, os alimentos a base de ovos, maionese e frango predominaram. Os resultados obtidos na quantificação variaram de <3 NMP até 4,6x10⁹.g⁻¹ desses alimentos, com mediana de 4,6x10⁶.g⁻¹. *S. Enteritidis* foi o sorovar identificado em todos os surtos, apresentando um único perfil de macro-restrição. Os dados obtidos foram utilizados para simular diferentes cenários no programa @Risk. Considerando-se o costume da população estudada de ingerir este produto após tratamento térmico, o risco encontrado foi muito baixo (6,12 x 10⁻⁷). Para uma pequena parte da população que costuma ingerir o produto sem qualquer tratamento térmico, em uma simulação realizada com 10.000 refeições, poderá haver 8,78 casos da doença, considerando a ingestão de uma única unidade. Em um perfil típico de preparação e consumo de lingüiça frescal de carne suína pela população de Porto Alegre, ou seja, como acompanhamento de churrasco, após tratamento térmico mínimo de 15 minutos, calculou-se a probabilidade de ocorrência de doença. Dentre os 3.354.716,98 churrascos estimados consumidos mensalmente em

Porto Alegre, o resultado do modelo indicou um mínimo de 0,01, média de 2,05 e máximo de 11,08 casos de doença por mês. Esse cenário infere que a lingüiça frescal de carne suína pode estar causando um baixo número de casos isolados em Porto Alegre, os quais podem estar sendo subnotificados.

Palavras Chave: análise de risco, *Salmonella*, lingüiça frescal de carne suína

ABSTRACT

In Southern Brazil, a high prevalence of Salmonella isolation has been reported in slaughter pigs, indicating that pork may represent a hazard to the consumers. In this sense, this study aimed to conduct a risk analysis of the consumption of pork sausage in Southern Brazil. For this purpose, Salmonella prevalence on pork sausages collected at retail level was estimated, growth and death curves for representative porcine Salmonella strains were constructed, the consumption patterns of pork sausages by the population were investigated, and foods involved in salmonellosis outbreaks were analysed. From a total of 336 samples of fresh pork sausage examined, Salmonella enterica was detected in 82 (24.4%) of the samples, with a Most Probable Number count ranging from 0.03 (MPN).g⁻¹ to 460 MPN.g⁻¹, and a median of 0.23 MPN .g⁻¹. Strains belonging to serovars Brandenburg, Panama, Derby and Typhimurium were the most prevalent. Growth and death curves of 12 strains representing Salmonella serovars isolated in this study were similar in assays conducted in nutrient broth. At room temperature, all Salmonella serovars started the exponential phase after a two hours period of lag phase. Under refrigeration, all isolates maintained the initial population counts up to 30 days. The heat destruction was observed after 20 minutes in all assays. Similar assays conducted in fresh pork sausages inoculated with Salmonella demonstrated that no growth of Salmonella sp. could be detected at room temperature and under refrigeration throughout the observation period. After cooking in the oven (200 °C) for 15 minutes the inoculated Salmonella population was completely destroyed. Foods containing eggs, mayonnaise or chicken were the most implicated in outbreaks investigated in Rio Grande do Sul. Salmonella counts varied from <3 MPN to 4.6x10⁹.g⁻¹ of foods involved in these outbreaks, with a median value of 4.6x10⁶.g⁻¹. All strains were identified as S. Enteritidis, and presented a unique macrorestriction profile, demonstrating the predominance of one clonal group in foods involved in the salmonellosis outbreaks. Data obtained in the conducted assays were used to simulate different scenarios, using the @Risk software. Considering that the population usually consumes pork sausage after termic treatment (roasting), the estimated risk was very low (6.12 x 10⁻⁷). Another simulation, conducted for the low percentage of the population (3%) that declared to consume raw pork sausage, indicated that for 10,000 meal consumption events of one sausage, the probability is 8.78 disease cases. Finally, considering the typical consumption pattern of pork sausage by the population of Porto

Alegre city (roasted for at least 15 minutes during a barbecue called “churrasco”) the number of disease cases was simulated. Among 3,354,716.98 “churrascos” prepared monthly in Porto Alegre city, the model indicated a probability of a minimum of 0.01 cases, a media of 2.05 and a maximum of 11.08 disease cases occurring each month. Results of risk assessment show that fresh pork sausage may have been a cause of few undernotificated individual salmonellosis cases in Porto Alegre city.

Keywords: *Pork, Risk assessment, fresh pork sausage*

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABLE 1- Distribution and quantification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars isolated from fresh pork sausages samples collected in Porto Alegre, Brazil.....41

TABLE 2- Antimicrobial resistance frequency among *Salmonella* isolates from fresh pork sausages by serovars.....42

CAPÍTULO 4

TABLE 1: *Salmonella* quantification in foods involved in outbreaks that occurred in Rio Grande do Sul, Brazil, in 2005.....77

CAPÍTULO 5

TABELA 1- Distribuição das variáveis.....92

TABELA 2- Descrição e distribuição das variáveis e modelos da avaliação de risco de salmonelose devido ao consumo de lingüiça frescal suína.....92

TABELA 3- Resultado do modelo ilustrando a estimativa de riscos de doença na população conforme intervalos de tempo de aquecimento. Simulação computacional com 10.000 iterações.....92

TABELA 4- Resultado do modelo ilustrando o número de casos de doença conforme intervalos de tempo de aquecimento. Simulação computacional com 10.000 iterações.93

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

FIGURA 1- *Xba*I-macrorestriction profiles identified in the most representative *Salmonella* serovars (De, *S. Derby*; Br, *S. Brandenburg*; Ty, *S. Typhimurium*; Pa, *S. Panama*) isolated from fresh pork sausage samples in Porto Alegre, Brazil. The dendrogram presents the similarity determined by Dice coefficient and UPGMA clustering.....43

CAPÍTULO 3

FIGURA 1- Curva de crescimento médio de isolados dos sorovares Brandenburg, Panama, Derby, Typhimurium, Agona, Senftenberg, Schwarzengrund, Infantis, Ohio, Orion, Cerro e Muenster de *Salmonella*, em água peptonada 0,1%, na temperatura ambiente (1A), sob refrigeração (1B) e destruição térmica (1C).....60

CAPÍTULO 4

FIGURE 1: *Xba*I-macrorestriction profiles identified in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from foods involved in outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil.....76

CAPÍTULO 5

FIGURA 1- Algoritmo representativo do processo de introdução e exposição à *Salmonella* na população estudada.....93

FIGURA 2- Curva de destruição do isolado do sorovar Typhimurium inoculado em lingüiça frescal suína.....94

FIGURA 3- Distribuição de probabilidade de casos por mês de salmonelose na cidade de Porto Alegre devido a ingestão de lingüiça frescal suína conforme o número de churrascos, com tempo de aquecimento de 15 minutos.....94

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1- Questionário epidemiológico.....	113
APÊNDICE 2- Curva de crescimento em temperatura ambiente, 26 á 31°C (A) e sob refrigeração, 8 á 12°C (B) do isolado se <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculado em lingüiça frescal suína.....	114
APÊNDICE 3- Outras produções realizadas durante o doutorado.....	115

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Introdução e Revisão Bibliográfica.....	13
1 Introdução	14
2 Revisão Bibliográfica.....	16
2.1 Características Gerais.....	16
2.2 Contaminação na granja.....	16
2.3 Salmonelose em suínos	17
2.4 Contaminação dos animais durante o transporte e espera pré-abate.....	18
2.5 Importância de animais portadores de <i>Salmonella</i> ao abate	18
2.6 <i>Salmonella</i> sp. como causa de toxinfecções alimentares.....	19
2.7 Embutidos	22
2.8 <i>Salmonella</i> em produtos suínos.....	23
2.9 Segurança dos alimentos.....	24
2.10 Análise de Risco.....	24
2.11 Temperatura de Armazenamento	25
CAPÍTULO 2- Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of <i>Salmonella</i> isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil.....	27
CAPÍTULO 3 – Crescimento e de destruição térmica de sorovares de <i>Salmonella</i> sp. isolados de lingüiça frescal de carne suína	49
CAPÍTULO 4- Quantification and molecular characterization of <i>Salmonella</i> isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil..	61
CAPÍTULO 5- Análise de risco quantitativa da presença de <i>Salmonella</i> sp. em lingüiça frescal suína em Porto Alegre/RS	79
CAPÍTULO 6- Discussão Geral	95
CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
APÊNDICES.....	113
Apêndice 1	113
Apêndice 2	114
Apêndice 3	115

CAPÍTULO 1: Introdução e Revisão Bibliográfica

1 Introdução

Salmonella é considerada um relevante patógeno encontrado em diversos tipos de alimentos, estando envolvida em grande parte das toxinfecções alimentares no Brasil e em diversos países.

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 10^5 à 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC). Diversos fatores de risco como a contaminação cruzada, a falta de higiene na preparação do alimento e o armazenamento em temperatura inadequada, podem permitir que o microrganismo se multiplique até atingir doses infectantes. Por outro lado, o processamento dos alimentos e o tratamento térmico antes do consumo podem contribuir para a redução da população de microrganismos presentes nos alimentos.

Os fatores que podem contribuir para aumentar ou reduzir a probabilidade da ocorrência de doenças causadas por um dado microrganismo transmitidas por determinado alimento são avaliados através da análise de risco. Esta análise compreende quatro etapas: identificação do perigo, a avaliação de risco, o gerenciamento do risco e a comunicação de risco. Enquanto o gerenciamento e a comunicação de risco são usualmente conduzidos pela indústria e pelas autoridades sanitárias de um país, a identificação do perigo e a avaliação de risco baseiam-se nas investigações conduzidas pela comunidade científica.

O isolamento de *Salmonella enterica* em suínos abatidos tem sido reportado no sul do Brasil, demonstrando que este patógeno pode estar presente no alimento causando risco à saúde do consumidor. Por outro lado, a maioria dos surtos notificados e investigados no Rio Grande do Sul aponta o sorovar Enteritidis e os alimentos preparados a partir de ovos como os mais implicados nos casos de salmonelose humana. A partir disso, é preciso investigar a discrepância entre o elevado número de suínos positivos para *Salmonella* ao abate encontrado na região e a ausência de surtos relacionados aos seus produtos.

Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar o risco que a ingestão de lingüiça frescal de carne suína pode representar para a infecção do consumidor por

Salmonella sp. e seus resultados foram apresentados em quatro artigos científicos abaixo relacionados:

- 1- Prevalência, caracterização genética e resistência a antimicrobianos de *Salmonella enterica* isolada em lingüiça frescal de carne suína no sul do Brasil.
- 2- Curvas de crescimento e de destruição térmica de sorovares de *Salmonella* sp. isolados de lingüiça frescal de carne suína.
- 3- Quantificação e caracterização molecular de *Salmonella enterica* presente em alimentos envolvidos em surtos de salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul.
- 4- Análise de risco quantitativa da presença de *Salmonella* sp. em lingüiça frescal suína.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Características Gerais

Atualmente, o gênero *Salmonella* está dividido em três espécies: *S. enterica*, *S. bongori* e *S. subterranea* (SHELOBOLINA et al., 2004) e em mais de 2.500 sorovares identificados, com vasta distribuição na natureza (POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2003), podendo estar presentes no trato gastrointestinal de diversos animais, incluindo peixes, répteis, pássaros e mamíferos (HIRSH, 1990; CLARKE & GYLES, 1993). A maioria dos sorovares não é adaptada a um único hospedeiro, podendo causar doença tanto no homem como em animais (WRAY & SOJKA, 1977; SCHWARTZ, 2000). No entanto, apenas um pequeno número dentre estes sorovares está freqüentemente associado à doença, como Typhimurium e Enteritidis (WRAY & SOJKA, 1977). Estes podem causar infecções intestinais de severidade variada, estando envolvidos nos casos clássicos de toxinfecções alimentares (VARNAM, 1991).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bacilos Gram negativos, predominantemente móveis pela presença de flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos, que apresentam metabolismo respiratório e fermentativo (HOLT et al., 1994). A partir da fermentação de D-glicose e outros carboidratos produzem ácido e gás (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Geralmente não fermentam a lactose (CLARKE & GYLES, 1993). São indol negativos, oxidase negativos, catalase positivos e produzem gás sulfídrico (HOLT et al., 1994).

A temperatura ótima para crescimento é 37°C (FRANCO & LANDGRAF, 1996), porém desenvolvem-se numa faixa de crescimento de 7°C a 45°C, são resistentes à dessecação e ao congelamento, possuindo a capacidade de sobreviver no ambiente por anos (WILCOCK & SCHWARTZ, 1993). No entanto, são sensíveis à luz solar e à maioria dos desinfetantes como fenóis, clorados e iodados (SOBESTIANSKY 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 destroem a *Salmonella* sp. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

2.2 Contaminação na granja

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, 1990; SOBESTIANSKY et al., 1999; BERENDS et al., 1997). Estima-se que entre 1 e 10% da contaminação de suínos terminados tem origem ainda nas Unidades de Produção de Leitões (UPLs), até 30% das infecções podem ser devidas à alimentação com rações contaminadas e as restantes provenientes da microbiota da granja, via contato direto ou indireto com animais portadores (BERENDS et al., 1997).

Baggesen et al. (1996) isolaram *Salmonella* nos dejetos (34%), fezes (25%), baias (24%), equipamentos (19%) e sistema de ventilação (12%), comprovando que a disseminação deste agente pode ser grande em uma propriedade, principalmente onde a infecção é clínica.

Do ponto de vista de um programa APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) o primeiro ponto de perigo em relação à *Salmonella* sp. é a granja, mais precisamente o índice de portadores presentes nas mesmas. É neste ponto que os programas de prevenção e controle devem iniciar com vistas à obtenção de um produto de boa qualidade e livre de *Salmonella* sp.

2.3 Salmonelose em suínos

Em geral a *Salmonella* não causa doença clínica em suínos (VAN DER GAAG et al., 2004; McDOWELL et al., 2007), sendo poucos os sorovares que constituem causa significativa de doença, como Choleraesuis e Typhimurium (SOBESTIANSKY et al., 1999).

A forma clínica da doença nos suínos pode se manifestar como uma septicemia aguda ou como uma enterocolite aguda ou crônica (SOBESTIANSKY et al., 1999). No Rio Grande do Sul, existem registros de formas entéricas e septicêmicas (BARCELLOS 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, 1991). Os suínos podem recuperar-se totalmente, mas alguns poderão permanecer como portadores e excretadores intermitentes por meses (WILCOCK & SCHWARTZ, 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. 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*. em seus tecidos, mas geralmente não excretam em suas fezes (WRAY & SOJKA, 1977).

É na condição de portadores hígidos que os suínos representam uma maior preocupação, pois neste estado se comportam como reservatórios de *Salmonella* e, conseqüentemente, disseminadores do microrganismo pelas fezes (ZEBRAL; FREITAS; HOFER, 1974). Estes portadores podem contaminar o ambiente, os equipamentos e as carcaças no abatedouro (WILCOCK & SCHWARTZ, 1993).

2.4 Contaminação dos animais durante o transporte e espera pré-abate

Outra etapa preocupante é o transporte até o abatedouro, o qual reduz a resistência do animal (LÁZARO; TIBANA; HOFER, 1997) podendo levá-lo a disseminar o microrganismo, contaminando os caminhões (WILCOCK & SCHWARTZ, 1993). Estes, por sua vez, tornam-se fonte de contaminação para os demais suínos e para o ambiente (SCHWARTZ, 1991) facilitando, desta forma, a transmissão oro-fecal de *Salmonella* (LÁZARO; TIBANA; HOFER, 1997). Morrow et al. (1999) concluíram que o transporte e a espera para o abate podem provocar uma infecção inicial das tonsilas podendo atingir o cólon e reto em duas horas.

Trabalhos realizados por Swanenburg et al. (2001a) e Rostagno et al. (2002), relatam que a permanência no pré-abate em curral de espera com alto nível de contaminação com *Salmonella* sp., pode ter efeito significativo no número de suínos infectados no abate, não somente através do efeito associado ao estresse, mas também como uma fonte de infecção. Mesmo a limpeza e desinfecção regular do curral de espera são medidas insuficientes para eliminar toda a contaminação por *Salmonella* presente (SWANENBURG et al., 2001b).

A diminuição da entrada de animais portadores no frigorífico é um ponto crucial entre as medidas de controle de *Salmonella*, uma vez que os esforços adotados dentro do frigorífico, para evitar a contaminação cruzada, não são capazes de eliminar o risco se a prevalência de entrada de portadores for muito alta.

2.5 Importância de animais portadores de *Salmonella* ao abate

Animais portadores contaminados na propriedade ou nas baias de espera podem contaminar o ambiente, os equipamentos e a carcaça no abatedouro (WILCOCK & SCHWARTZ, 1993). Através da inspeção da carne, pode haver exposição dos linfonodos contaminados e contaminação cruzada da carcaça (MÔO 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 et al., 1994). Da mesma forma a contaminação cruzada pelo conteúdo intestinal é de grande importância durante o processamento. Swanenburg 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.

Em estudo prévio realizado no Rio Grande do Sul, a prevalência de suínos portadores assintomáticos de *Salmonella* sp. em linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal, no momento do abate, foi de 55,6% (BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004). Linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal positivos podem ser responsáveis pela contaminação cruzada de carcaças durante o processamento, mas não são produtos que chegam até o consumidor.

Castagna et al. (2004a) 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. Da mesma forma, Swanenburg et al. (2001a), indicaram o risco potencial destes animais durante o processamento, encontrando correlação significativa entre presença de *Salmonella* sp. em tonsilas e conteúdo intestinal com carcaças positivas na linha de abate.

A redução de patógenos em carnes vermelhas e de aves é a prioridade das indústrias, a qual não é considerada uma tarefa simples. Quando a produção, processamento, distribuição e a cadeia de preparação entender seus respectivos papéis na segurança alimentar, a possibilidade do fornecimento de carnes vermelhas e de aves mais seguras será possível (AMI, 2007).

2.6 *Salmonella* sp. como causa de toxinfecções alimentares

Salmonella é conhecida como causa de doença a mais de 100 anos (CDC, 2007), é o mais importante contaminante de produtos alimentares e um dos principais agentes bacterianos responsáveis por surtos de toxinfecções alimentares em diversos países (LACONHA et al., 2000; LOPALCO et al., 2000). Todo ano, aproximadamente 40.000 casos de salmonelose são relatados nos Estados Unidos e é estimado que aproximadamente 600 pessoas morrem por ano com salmonelose aguda (CDC, 2007).

A transmissão de *Salmonella* sp. ao homem, através da população animal, pode ocorrer pelo contato direto com os animais tanto nas granjas como nos frigoríficos. Mais freqüentemente ocorre pela ingestão de produtos de origem animal contaminados (WEGENER & BAGER, 1997), o que pode resultar em toxinfecções alimentares (LEITÃO, 1988).

Em humanos, os sintomas iniciais da doença são náusea e vômito, 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 (ATLAS, 1997). A duração é, usualmente, de 4 à 7 dias e a maioria das pessoas se recupera sem tratamento. No entanto, em alguns indivíduos a diarreia pode ser tão severa que o paciente precisa ser hospitalizado. Nestes pacientes a infecção pode invadir a corrente sanguínea levando à septicemia e aumentando o risco de óbito, a não ser que o paciente seja tratado rapidamente com antibióticos. Idosos, crianças e aqueles com o sistema imune comprometido são mais suscetíveis à doença severa (CDC, 2007).

O risco de desenvolver uma salmonelose pelo consumo de alimento é influenciado por diversos fatores: a quantidade de *Salmonella* sp. presente, a composição do produto, manipulação e práticas no preparo do alimento, suscetibilidade dos consumidores primários, entre outros (WEGENER & BAGER, 1997).

Dependendo do sorovar e do alimento, a dose infectante em pessoas saudáveis pode variar de menos de 10^3 unidades formadoras de colônia (UFC) no caso de sorovares adaptados ao homem, até $10^5 - 10^7$ UFC para sorovares não adaptados. Em alimentos com elevado teor de gordura e proteínas, a dose infectante pode ser menor devido à proteção das células contra o suco gástrico (VARNAM, 1991).

Doenças transmitidas por alimentos causadas por *Salmonella* são consideradas um grande problema para a saúde pública (EUROPEAN COMMISSION, 2000). Embora os produtos derivados de frangos sejam os mais envolvidos em surtos na Itália (SCUDERI; SQUARCIONE; GRECO, 1993), a contaminação por produtos suínos também é comum (CANTONI; D'AUBERT; TRALDI, 1993).

Devido ao aumento da incidência de casos em humanos durante os últimos 15 anos, *Salmonella* tem sido o microrganismo mais pesquisado na Dinamarca (HALD et al., 2004). Desde 1998, na Dinamarca, aproximadamente 25.000 amostras têm sido analisadas pela vigilância nacional de carne suína fresca. Adicionalmente, 37.000 “pools” de amostras exportadas (cada “pool” consistindo de cinco amostras) têm sido

examinados por ano. A *Salmonella* foi isolada em aproximadamente 1% das amostras (ANON, 2000b).

Em pesquisas realizadas na Inglaterra e País de Gales, dos 101 surtos alimentares analisados, *Salmonella* foi responsável por mais da metade desses (RYAN et al., 1996; HUGHES; GILLESPIE; O'BRIEN, 2007). Segundo Hughes, Gillespie e O'brien (2007), *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis fagotipo 4 foi o mais comum, enquanto outros fagotipos de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram identificados no restante das amostras.

No Brasil, um notável aumento na incidência de *S. Enteritidis* em toxinfecções alimentares em humanos e em produtos avícolas tem sido relatado desde a década de 90 (FUZIHARA; FERNANDES; FRANCO, 2000; SANTOS et al., 2000). A ocorrência de *S. Enteritidis*, no Estado de São Paulo, tem aumentado acentuadamente desde 1994, sendo este o sorovar mais freqüente, responsável por surtos de toxinfecções alimentares e casos esporádicos de doenças gastrointestinais em humanos (TAVECHIO et al., 1996; PERESI, et al., 1998).

No Rio Grande do Sul (2001), baseado em análises e dados microbiológicos, relatórios anuais da DVS/RS demonstraram *Salmonella* sp. como o principal agente etiológico responsável por toxinfecções alimentares nos últimos anos. Segundo Gottardi (2003), em Porto Alegre foram notificados 303 surtos no período de 1995 a 2002, envolvendo 7.373 pessoas. O principal agente etiológico identificado nos surtos foi a *Salmonella* sp. (24,22 %), seguida por *Staphylococcus aureus* (12,42%). Os alimentos mais freqüentemente envolvidos nestes surtos foram aqueles que continham ingredientes de origem animal (60%), como os pratos preparados, produtos de confeitaria, carne, leite e derivados. Foi possível relacionar 11 diferentes fatores predisponentes durante os oito anos de estudo, sendo o mais prevalente a refrigeração inadequada (33,33%) e a manutenção dos alimentos em temperatura ambiente por um período superior a duas horas (28,3%).

Em trabalho realizado por Geimba et al. (2004), no Rio Grande do Sul, durante 1999 e 2000, foram investigadas 75 isolados de *Salmonella* provenientes de alimentos envolvidos em surtos, onde 73 (97%) foram classificados como *S. Enteritidis*. Todas as cepas de *Salmonella* isoladas em 1999 foram sorotipadas como Enteritidis, no entanto, duas amostras, em 2000, foram classificadas como *S. Derby* e *S. Typhimurium*. Este resultado aponta *S. Enteritidis* como causa predominante de gastroenterite em humanos

no RS durante o período investigado. Este sorovar de *Salmonella* tem sido reconhecido como a maior causa de salmonelose em todo o mundo (AGRON et al., 2001) e tem sido o sorovar mais isolado em intoxicações alimentares na Inglaterra e País de Gales (LIEBANA et al., 2002), França (BOUVET et al., 2002) e EUA (LIN et al., 1996).

No Brasil a preocupação com a segurança dos alimentos é crescente. Os Ministérios da Saúde (MS) e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), encarregados de gerenciar as questões de segurança dos alimentos, têm revisado e atualizado a legislação e têm implementado programas para avaliar o comportamento e a condição do perigo em determinados elos da cadeia. O MAPA implantou o programa para avaliar o problema relacionado com *Salmonella* no abate de aves, enquanto o MS está trabalhando a questão deste mesmo perigo, buscando a quantificação de *Salmonella* nos produtos expostos à comercialização (PAS, 2004).

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).

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 & TERRA, 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 & TERRA, 1985).

De acordo com Haack, Bernardi e Rivero (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 hígidos. Além disso, a carne dos animais submetidos a extremas condições fisiológicas, isto é, às chamadas influências de estresse, exibe uma maturação deficiente que se traduz em uma acidificação deficiente ou num elevado valor do pH.

2.8 *Salmonella* em produtos suínos

Os suínos têm sido identificados em diversos países como importantes portadores de *Salmonella* (HALD et al., 2003; DAVIES et al., 2004) e nos últimos anos a carne suína, cada vez mais, reconhecida como potencial origem de salmonelose humana (HALD et al., 2003).

No México, Bello-Pérez (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 et al. (1999), no mesmo país, encontraram 88,3% de embutidos positivos.

Chaves et al. (2000), no Rio de Janeiro, encontraram 10% das amostras de lingüiça frescal de origem suína positivas para *Salmonella* sp., enquanto Tavechio et al. (2002) relataram 5% de ocorrência de *Salmonella* em salsicha em São Paulo e Lobo et al. (2001) encontraram a mesma percentagem em salames coloniais positivos no Rio Grande do Sul. Lírio et al. (1999) observaram que a lingüiça crua (10%) foi o segundo alimento que originou maior número de isolamentos de *Salmonella* em São Paulo.

Surtos devido a lingüiças contaminadas têm sido relatados nos Estados Unidos, onde a *S. Typhimurium* foi isolada (SAUER et al., 1997). Na Itália, *Salmonella* tem sido isolada de lingüiças de carne de suínos e também em curados (GIOVANNINI et al., 2004).

Em trabalho realizado por Giovanninni et al. (2004), na Itália, de um número total de 595 amostras de produtos suínos, 58 (9,7%) foram encontradas contaminadas por *Salmonella*. Quarenta (17,6%) das 227 lingüiças frescas, 9 (8,9%) das 101 lingüiças secas e 9 (5%) das 180 carnes frescas foram positivas para *Salmonella* sp. *S. Typhimurium* foi a mais frequentemente isolada (35,5%), sorovar esse que é o segundo maior causador de salmonelose em humanos (20,3% dos casos) na Itália (SCUDERI; SQUARCIONE; GRECO, 1993).

Assim sendo, disponibilizar produtos livres de patógenos ou com baixos níveis de contaminação tornou-se uma necessidade para entrar no mercado, uma vez que a demanda por produtos suínos seguros e de qualidade constituem um filtro do consumidor para o produtor. Desta forma, produtores de suínos que enviam ao mercado um alimento seguro (com reduzido ou não detectável nível de *Salmonella*) podem ter vantagens na comercialização (GORTON; KLIEBENSTEIN; BERAN, 1996).

2.9 Segurança dos alimentos

A segurança dos alimentos trata da proteção e preservação da vida e da saúde humana dos riscos representados por possíveis perigos estarem presentes nos alimentos (PAS, 2004).

É considerado perigo o agente de natureza biológica, física ou química, com potencial para causar danos à saúde do consumidor. A existência do perigo é um alerta que, no geral, significa realmente a possibilidade de ocorrer o dano (PAS, 2004), sendo o risco a possibilidade do perigo se manifestar (NOTERMANS et al., 1996). A questão do número ou concentração do perigo biológico é complexa e, no geral, considera-se que o nível aceitável do perigo é aquele inferior à concentração capaz de causar danos à saúde (PAS, 2004).

O conhecimento da dimensão e a possibilidade da ocorrência do risco em alimentos demandam, portanto, um estudo estruturado e consistente dos dados científicos e de um julgamento de valor. O fortalecimento e o encaminhamento da ciência para o conhecimento que visa à solução desses problemas é uma necessidade crescente nos dias atuais. Para tanto é necessário direcionar, dirigir e gerenciar estes conhecimentos (PAS, 2004).

O aumento da preocupação dos efeitos decorrentes da presença de perigos em alimentos e da globalização da economia tem estimulado os órgãos internacionais, os governos e o setor produtivo de alimentos a considerar novas estratégias, assim como aprimorar as existentes, para a redução dos riscos associados aos agentes de toxinfecções alimentares. A estratégia mais importante da atualidade é o processo de análise de risco (PAS, 2004), que tem alcançado cada vez mais importância na microbiologia de alimentos (SERRA et al., 1999).

2.10 Análise de Risco

A análise de risco é um processo que objetiva estimar o risco da doença em dada população por determinado patógeno e entender os fatores que influenciam esse processo (FORSYTHE, 2002). É ordenada e envolve gestores e avaliadores de risco, envolvidos e interessados, que tem a finalidade de obter as bases científicas para dimensionar risco, avaliar as medidas sanitárias e facilitar a opção das formas de controle (PAS, 2004). Segundo Murray et al. (2006), conforme estrutura da OIE, este processo tem quatro componentes: Identificação do Perigo, Avaliação, Gestão e Comunicação de Riscos.

A Identificação do Perigo é o processo que identifica os agentes patogênicos, capazes de transmitir doença (MURRAY et al., 2006).

A Avaliação de Risco objetiva a avaliação de toda informação científica disponível, relacionada com o perigo no alimento, objeto do desencadeamento do processo de Análise de Risco (PAS, 2004). Conforme Murray et al. (2006) e Toma et al. (1999) na estrutura da OIE, a avaliação de risco compreende quatro etapas:

- Probabilidade de introdução- descrição e quantificação da probabilidade de introdução de um agente patogênico, a partir de animais ou de produtos de origem animal submetidos a análise de risco.

- Avaliação da exposição: compreende uma descrição e uma quantificação da probabilidade de exposição aos agentes patogênicos envolvidos.

- Avaliação das conseqüências: descrição dos efeitos adversos, incluindo as conseqüências econômicas associadas ao agente patogênico associado aos produtos de origem animal submetidos a análise de risco.

- Estimativa do risco: feita pela integração das etapas de avaliação de riscos descritos. Utiliza modelos matemáticos e estatísticos para estimar a probabilidade dos efeitos adversos e da severidade de um perigo que pode ocorrer em indivíduos de uma determinada população.

A gestão de Riscos é um processo distinto da avaliação de risco, de ponderação e seleção das alternativas e políticas de proteção à saúde, por consulta aos interessados e envolvidos e considerando a avaliação de riscos. Quando necessário, é processo de seleção das opções para o controle e prevenção de risco por consumo de alimentos (PAS, 2004).

A Comunicação de Riscos é o processo de troca interativa de informações e opiniões durante o processo de análise, a respeito do risco, dos fatores relacionados a eles, e da percepção do risco entre gestores e avaliadores, consumidores, indústrias, comunidade acadêmica e científica e outras partes envolvidas e interessadas (FORSYTHE, 2002).

2.11 Temperatura de Armazenamento

O armazenamento em temperatura adequada é importante, pois aumenta a vida útil de prateleira e mantém a qualidade dos alimentos expostos à venda. Germano & Germano (2001) mencionam que os alimentos podem ser inspecionados sob o aspecto sanitário e industrializados de acordo com as técnicas mais modernas, mas se não forem

armazenados adequadamente no varejo, ou até na residência do próprio consumidor, podem perder toda a sua qualidade em razão de estocagem.

O uso correto dos equipamentos de frio reduz significativamente a deterioração dos alimentos e os riscos à saúde do consumidor (HAZELWOOD & McLEAN, 1996; HOBBS & ROBERTS, 1998). Os alimentos, ainda que devidamente processados e embalados, têm presença de bactérias em maior ou menor quantidade, que são inerentes a sua natureza. Quanto menor for a temperatura de armazenamento, mais lentas serão as reações químicas, a atividade enzimática e a multiplicação dos microrganismos e maior será o tempo que os alimentos poderão ser armazenados antes do seu consumo (THOMSON; WHITEHEAD; MERCURI, 1974; INMETRO, 1996).

Carnes e subprodutos de carnes são relatados freqüentemente como responsáveis por intoxicações alimentares por *Salmonella* em humanos (BRYAN, 1980), usualmente devido à contaminação pós-processamento do alimento cru combinada com o armazenamento em temperatura inadequada (JUNEJA et al., 2007). A refrigeração incorreta, bem como o armazenamento e transporte de carne suína em temperatura $>7^{\circ}\text{C}$ podem permitir a multiplicação de *Salmonella* (ICMSF, 1998).

Em trabalho realizado por Mürmann, Mallmann e Dilkin (2005), na cidade de Santa Maria, RS, observou-se que 29,7% dos equipamentos de resfriamento apresentaram temperaturas médias inadequadas, segundo o recomendado pela Legislação Sanitária vigente, o que concorda com Desire & Tondo (2001) que, no mesmo Estado, encontraram desacordo em 25% das câmaras frias analisadas. Em pesquisa realizada por Carreira et al. (2003), 37,5% dos balcões de refrigeração, na cidade de Belém/PA, encontravam-se em temperatura acima de 7°C .

Hiluy (1997) afirma que os alimentos perecíveis necessitam condições especiais de armazenagem e é necessário que a refrigeração acompanhe esses produtos desde sua produção até o consumo. A organização técnica e econômica que executa essa tarefa é denominada “cadeia de frio” que inclui os frigoríficos, meio de transporte, câmaras e balcões frigoríficos, em supermercados, panificadoras, restaurantes, etc., e as geladeiras e congeladores domésticos. AMI (2007) afirma que é considerado ponto crítico a temperatura de refrigeração da carne para controle da multiplicação bacteriana e, segundo Flynn, Blair e Mcdowell (1992) e Johnson et al. (1998), muitos refrigeradores domésticos são incorretamente ajustados, operando abaixo da temperatura recomendada, permitindo um crescimento significativo de microrganismos mesófilos como a *Salmonella*.

CAPÍTULO 2- Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil

SUBMETIDO: FOOD CONTROL, 2007

**Prevalence, genetic characterization and antimicrobial
resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in
Porto Alegre, Brazil**

Lisandra Mürmann¹, Maria Cecília dos Santos¹, Marisa Cardoso^{1*}

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Corresponding Author: Marisa Cardoso, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av.

Bento Gonçalves 9090, 90540-000. Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55-513-316-6123,

Fax: +55-513-316-7305.

E-mail address: mcardoso@ufrgs.br

Abstract

A total of 336 samples of fresh pork sausage randomly obtained from supermarkets and butcher shops in Porto Alegre city, Brazil, was examined for the presence of *Salmonella* serovars. *Salmonella enterica* was detected in 82 (24.4%) samples, with a Most Probable Number (MPN) count ranging from 0.03 MPN.g⁻¹ to 460 MPN.g⁻¹. Strains belonging to the most isolated *S. enterica* serovars (Brandenburg, Panama, Derby and Typhimurium) were further characterized by *Xba*I-macrorestriction, resulting in a total of 17 profiles. Resistance to tetracycline was the most prevalent among the *Salmonella* isolates. *S. Panama* and *S. Typhimurium* presented the greatest number of resistance phenotypes.

Keywords: Antimicrobial resistance, PFGE, pork sausage, *Salmonella*

1. Introduction

Salmonella is the leading cause of food-borne illness in Southern Brazil, with foods of animal origin being reported as the major vehicle of this pathogen (Costalunga and Tondo, 2002; Geimba, Tondo, Oliveira, Canal and Brandelli, 2004). Although contaminated eggs and raw or undercooked poultry are the most involved food vehicles human salmonellosis cases worldwide (Rabsch, Tschäpe and Bäumlner, 2001), it was estimated that pork causes 15-20% of all human cases of *Salmonella* infection (Berends, Urlings, Snijders and van Knapen, 1996).

The Southern region of Brazil is the most important area for swine production in the country. Its pork output accounted for two thirds of the country's total production, which consisted of 2.8 million tons in 2006. Approximately 70% of the pork in Brazil is consumed in the form of processed meat products (sausages, bacon and ham). Among these, fresh pork sausages are widely consumed in Southern Brazil, and are usually roasted in restaurants and households.

Pork contamination by *Salmonella* can occur at multiple stages along the production chain. Moreover, the level of *Salmonella* infection of pigs on farms can be increased during transport, lairage and slaughtering-plant operations (Swanenburg, Urlings and Snijders, 2001; Vieira-Pinto, Tenreiro and Martins, 2006).

Studies conducted in Southern Brazil have show a high carriage rate of *Salmonella* in pigs at slaughter (Bessa, Costa and Cardoso, 2004), which was associated with the increased isolation of *Salmonella* from batches of minced meat included in the production of fresh sausage (Castagna, Schwarz, Canal and Cardoso, 2004). Thus, a survey to estimate the frequency and level of *Salmonella* contamination of fresh pork sausage at retail outlets in Porto Alegre, Southern Brazil, was conducted.

2. Material and methods

2.1. Sample collection

Fresh pork sausage samples (n=336) prepared in industrial food processing plants, including prepackaged (n=155) and store-packaged sausage samples (n=181), were randomly purchased from 36 butcher's shops and supermarkets in Porto Alegre city, Brazil. Stores were located in five central boroughs of the city and were identified using phone books. Thirty three retail stores were visited twice and in three stores only one sampling was conducted. Sampling visits were made every Monday for eight months (April to November 2005). On each sampling day, three stores were randomly chosen in one of the five boroughs. Five prepackaged or store-packaged raw pork sausages were randomly selected in each store and transported on ice to the laboratory. All sampled pork sausages were stored under refrigeration at the stores.

2.2 Salmonella isolation

Approximately 8 g of minced meat were removed aseptically from the casing of three sausages belonging to the same purchased sample and put in a stomacher bag, until a 25 g-aliquot was obtained. The remaining sausage portions were stored in sterile flasks for up to seven days at 4°C. To each stomacher bag, 250 ml of buffered peptone water (BPW, Merck, Darmstadt, Germany) was added as pre-enrichment media, and the mixture was homogenized. After incubation at 37°C for 18 h, aliquots of 0.1 ml or 1.0 mL were transferred to Rappaport-Vassiliadis broth (RV, Merck) or Tetrathionate broth (Difco Laboratories, Detroit, USA), respectively. After incubation at 42°C for 24 h, broth cultures were streaked onto both Xilose-Lisina-Tergitol 4 (XLT4, Difco) agar and Brilliant Green Lactose Saccharose (BPLS, Merck) agar. Plates were incubated at 37°C for 24 h. Up to 5 colonies were selected from each plate and were streaked on Triple

Sugar Iron agar (TSI, Merck), Lysine Decarboxylase Iron agar (LIA, Merck) and inoculated into urea broth (Merck). Colonies presumptively identified as *Salmonella* were submitted to slide agglutination tests using poly-O antiserum (Probac, São Paulo, Brasil) and were serotyped at the Brazilian *Salmonella* Reference Institute (Instituto Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil).

2.3 *Salmonella* quantification

Fresh pork sausage samples, from which *Salmonella* was isolated, were submitted to estimation of *Salmonella* using a Most Probable Number (MPN) technique (Sinell, Pietzsch, Klingbeil and Benner, 1990). From each positive sample, which was kept refrigerated, three portions of each 10 g, 1 g and 0.1 g were taken aseptically and added individually to pre-enrichment tubes with BPW. After incubation of the pre-enrichment tubes at 37°C for 18 h, aliquots of 0.1 ml were transferred to 9.9 ml of RV. Following incubation of the tubes of selective enrichment media at 42°C for 24 h, the samples were streaked onto XLT4 agar. After 24 h incubation at 37°C, suspected colonies from each plate were confirmed as *Salmonella* by biochemical tests and agglutination using poly O-antiserum (Probac). The number of tubes in each dilution, from which colonies were confirmed as *Salmonella*, was used to estimate *Salmonella* quantification using the MPN table (BAM, 1998).

2.4. Macrorestriction analysis

Genomic DNA of *Salmonella* isolates, belonging to representative serovars, was prepared as previously described (Schwarz and Liebisch, 1994; Liebisch and Schwarz, 1996). Slices of DNA-containing agarose plugs were digested with 20 units of *Xba*I (Promega, Madison, WI, USA) at 37°C for 18 h. The respective fragments were

separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in 1% PFGE-certified Agarose gel (BioRad, Hercules, CA, USA) in a CHEF DR II system (BioRad, California, USA) at 5.6 V/cm with 0.5× TBE as the running buffer. In order to avoid the DNA degradation of *Salmonella* Panama isolates, 50 µm of Thiourea (Acros Organics, Geel, Belgium) was added to the running buffer. The pulse times were increased from 10 to 30 s during the first 11 h and subsequently from 30 to 50 s during the next 13 h. The gel was stained with ethidium bromide (2 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) and photographed under UV-illumination. The *Xba*I fragments of *S. Typhimurium* LT2 served as size standards (Liu, Hessel and Sanderson, 1993). Patterns produced by PFGE were compared using the GelCompar II software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Dendrograms were constructed by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) using the Dice coefficient.

2.5. Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial resistance was determined by agar disk diffusion tests using disks with the following antimicrobials (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brazil): amikacin (Am, 30 µg), ampicillin (Ap, 10 µg), cefaclor (Ce, 30 µg), ciprofloxacin (Ci, 5 µg), chloramphenicol (Cm, 30 µg), gentamicin (Ge, 10 µg), nalidixic acid (Na, 30 µg), tetracycline (Te, 30 µg), tobramycin (To, 10 µg), streptomycin (Sm, 10 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (St, 25 µg), and sulfonamide (Su, 300 µg). The testing was conducted and evaluated according to the document M2-A8 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS, 2005). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a control.

3. Results

Salmonella enterica was detected in 82 (24.4%) samples of the fresh pork sausages collected at retail level in Porto Alegre city, Brazil. Positive samples were identified in fresh pork sausages belonging to 12 of 22 brands included in this study. No statistical difference ($p=0.64$) was detected in the frequency of *S. enterica* isolation between prepackaged (36/155) and store-packed (45/181) samples. Except for one strain identified as belonging to the subspecies *houtenae*, the remaining strains belonged to the subspecies *enterica*. Isolates were assigned to 12 serovars of *S. enterica* subsp. *enterica* (Table 1), most of them belonging to serogroups B (58%) and D1 (22.2%).

S. enterica could not be re-isolated from 20 samples during the quantification assays. In the remaining 62 positive samples the level of *S. enterica* varied from 0.03 MPN.g⁻¹ to 460 MPN.g⁻¹ (Table 1), with a median value of 0.23 MPN.g⁻¹. The single fresh pork sausage sample with a previous isolation of *S. enterica* subsp. *houtenae* demonstrated a low level of contamination (0.03 MPN.g⁻¹).

Strains belonging to the four most commonly isolated *S. enterica* serovars (Brandenburg, Panama, Derby and Typhimurium) were further characterized by *Xba*I-macrorestriction, resulting in a total of 17 profiles with 10-24 fragments each (Figure 1). *S. Derby* (De patterns) and *S. Brandenburg* (Br patterns) presented the highest diversity. The similarities among the different profiles in these serovars varied in the range 38.7-96.8%. Contrarily, *S. Panama* (Pa patterns) was the most homogeneous with only two different profiles and an overall similarity of 83.3%. Similar *Xba*I-macrorestriction profiles were distributed among fresh pork sausages samples of different brands (Figure 1). Nevertheless, members of some profiles (Br3, De3 and Pa1) were obtained from sausage samples of the same brand collected during different sampling events (data not shown).

One isolate from each positive sausage sample was submitted to antimicrobial susceptibility testing. Of a total of 82 strains analyzed, sixty-four (82%) displayed resistance to at least one antimicrobial agent. The isolates showed an overall resistance to 11 of the 14 drugs tested. The highest frequency of resistance was observed to tetracycline (70.7%) followed by sulfonamide (54.9%). None of the strains were resistant to amikacin, cefaclor or ciprofloxacin. The frequency of resistance against antimicrobials varied among serovars (Table 2).

Among the 64 strains which showed resistance, 55 (85.9%) were found to be resistant to more than one antimicrobial. Thirty different multidrug-resistance (MDR) patterns were found, and most of them were represented by only one strain. Among the most prevalent serovars, the MDR pattern StSuTe was the most commonly found.

4. Discussion

The present study demonstrated that *Salmonella enterica* was isolated from 24.4% of fresh pork sausages obtained from supermarkets and butcher's shops in Porto Alegre city, Brazil. Fresh pork sausages were chosen because of their wide availability in grocery stores and common consumption in this region. Frequencies of *Salmonella* isolation from pork sausages vary widely among different countries, and rates between 1.7% in Ireland (Boughton, Leonard, Egan, Kelly, O'Mahony, Markley et al., 2004) to 88.3% in Mexico (Escartin, Castillo, Hinojosa-Puga and Saldaña-Lozano, 1999) have been reported.

Among the 82 *Salmonella* isolates from pork sausages in this study, only one strain did not belong to *S. enterica* subsp. *enterica*. The relevance of this finding is uncertain, since in Brazil less than 1% of 4,581 *Salmonella* strains isolated from non-human sources have been identified as *S. enterica* subsp. *houtenae* (Tavechio, Ghilardi,

Peresi, Fuzihara, Yonamine, Jakabi et al., 2002), and human infections associated with this subspecies are considered rare. Nevertheless, a case of bacteremia in a 33-year-old HIV-infected patient caused by *S. enterica* subsp. *houtenae* was diagnosed in Rio de Janeiro (Lourenço, Reis, Valls, Asensi and Hofer, 2004). In this case, close contact with animal reservoirs or contamination through ingested food were indicated as possible sources of infection.

Salmonella enterica subsp. *enterica* strains belonging to serogroups B and D1 accounted for 77.8% of all isolates. These serogroups were also the most prevalent in porcine samples collected at slaughterhouses in southern Brazil (Bessa et al., 2004; Castagna et al., 2004), and seem to be the most relevant to the swine industry in this region. The most isolated serovars in our study are frequently isolated from pork (Escartin et al., 1999; Botteldoorn, Herman, Rjipens and Heyndrickx, 2004) and were reported as the cause of several outbreaks in humans (Herikstad, Motarjemi and Tauxe, 2002). *S. Typhimurium* specifically constitutes a major pathogen responsible for salmonellosis in humans (Mead, Slutsker, Dietz and McCaig, 1999; Rabsch et al., 2001). Contrary to this, only *S. Typhimurium* is among the top 10 serovars isolated from human patients and from non-human sources in Brazil (Taunay, Fernandes, Tavechio, Neves, Dias and Irino, 1996; Tavechio, Fernandes, Neves, Dias and Irino, 1996). In this country, *S. Enteritidis* has been the most prevalent serovar from every kind of source (Tavechio et al., 2002), and was also identified in 97% of foods involved in outbreaks occurring in the same region of our study (Geimba et al., 2004). In both studies poultry meat, eggs and homemade mayonnaise accounted for the majority of foods implicated in food borne outbreaks, while pork represented less than 1% of the samples.

In accordance to other reports (Sinell et al., 1990; Escartin et al., 2000), *Salmonella* could not be re-isolated from 20 sausage samples in our study using the quantitative assay, although corresponding portions of the same samples had been positive in the qualitative assay. The heterogeneous distribution and the overall low number of salmonellae in the sample may be pointed as the cause of failure in the re-isolation of salmonellae from meat (Sinell et al., 1990). Similar to other studies of *Salmonella* quantification in pork, the great majority of samples in our study demonstrated a level of contamination below 100 MPN.g⁻¹ (Sinell et al., 1990; Escartin et al., 1995; Giovannini et al., 2004). In spite of the generally low level of contamination found, and the habit of eating pork sausages well-done in Southern Brazil, every *Salmonella*-positive sample may represent a potential health hazard. Furthermore, contaminated sausages may also represent a potential source of cross contamination in the kitchen environment and for ready-to-eat foods.

The potential sources of the high *Salmonella* prevalence found in pork sausages were investigated by analyzing *Xba*I-macrorestriction profiles of strains belonging to the most isolated *Salmonella* serovars. Although strains of some profiles (Br3, De3 and Pa1) were obtained from sausage samples of the same brand, in most cases similar profiles were distributed among fresh pork sausages samples of different brands. Furthermore, most *Salmonella* strains isolated from sausage samples of the same brand presented different profiles or belonged to different serovars. These results reflect the complexity of the *Salmonella* transmission chain, which provides many opportunities for infection/reinfection and cross contamination on pre-harvest and post-harvest stages. Moreover, as demonstrated in previous studies (Duffy, Belk, Sofos, Bellinger, Pape and Smith, 2001; Castagna et al., 2004), pork products, such as sausages, which are exposed to more extensive handling than regular meat have a higher risk of *Salmonella*

contamination at food processing plants. Furthermore, in butchers' shops many opportunities for cross contamination of store-packed products are also present. During cutting and handling, the microbial load is redistributed throughout the product and can increase due to exposure to other contamination sources, such as knives and work tables (Berends et al., 1996; Reij, den Aantrekker and ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force, 2004). In this sense, cross contamination at retail level could explain store-packed sausage samples of different brands purchased in the same store which presented *Salmonella* strains with a common *XbaI*-macrorestriction profile in two sampling events of our study.

Multidrug-resistant *Salmonella* spread by food animals represents an additional public health risk (Cruchaga, Echeita, Aladueña, García-Peña, Frias and Usera, 2001). In this study, we demonstrated the widespread occurrence of antimicrobial resistance to tetracycline and sulfonamide in *Salmonella* strains isolated from fresh pork sausages. This finding is in accordance with previous studies of *Salmonella* strains isolated from slaughtered pigs in Brazil (Oliveira, Carvalho, Fernandes, Tavechio, Menezes and Domingues Jr., 2002; Michael, Cardoso and Schwarz, 2006; Bessa, Michael, Canu, Canal, Cardoso, Rabsch et al., 2007). Moreover, a relatively high frequency of chloramphenicol resistance in isolates tested in this study and elsewhere (Bessa et al., 2007) was also detected. Tetracycline and sulfonamide have been widely used in pig production in Brazil, and this fact can explain the high rates of resistance which were found. On the other hand, chloramphenicol was banned from animal production in Brazil more than a decade ago. The occurrence of resistance against this antimicrobial could possibly be due to the emergence and spread of multi-drug resistant *Salmonella* isolates that harbour physically linked resistance to this drug, as previously reported (Briggs and Fratamico, 1999). Contrary to the increasing incidence of ciprofloxacin-

resistant *S. Typhimurium* reported in other countries (Threlfall, Ward and Rowe, 1997; Angulo, Johnson, Tauxe and Cohen, 2000), we did not find resistance to ciprofloxacin. However, a marked resistance to nalidixic acid was detected in the most prevalent serovars (except for *S. Derby*) isolated from fresh pork sausages. This is a matter of concern, since nalidixic acid resistance has been associated with a decrease in susceptibility to fluoroquinolones, which is used to treat salmonellosis in humans (Gorman and Adley, 2004).

In our study, 30 different MDR patterns were found, and two serovars commonly involved in food borne outbreaks, *S. Panama* and *S. Typhimurium*, presented the greatest number of resistance phenotypes, and may reflect a reservoir of resistance in animals which can be transmitted to humans. Contrarily, the most common resistant phenotype presented by *S. Typhimurium* DT104 strains (resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, and tetracycline) (Beaudin, Brosnikoff, Grimsrud, Heffner, Rennie and Talbot, 2002) was not detected in strains of our study. As antibiotic usage varies among countries, different patterns of resistance phenotypes and genotypes can be expected. Thus, the monitoring of antimicrobial resistance patterns presented by pathogenic strains isolated from different sources and regions is an important issue.

Our data confirms that raw pork sausages may be vehicles for transmitting *Salmonella enterica* in Southern Brazil. To diminish contamination rates by *Salmonella* in fresh pork sausages, it is critical that risk reduction strategies are used throughout the food chain. These strategies should include on-farm practices which reduce pathogen carriage, increased hygiene at slaughter and meat processing, continued implementation of Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP), and increased consumer education efforts.

Acknowledgements

The authors thank to Beatriz M. Falavigna (Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil) for serotyping the *Salmonella* strains. This study was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq (L. Mürmann).

Table 1 Distribution and quantification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars isolated from fresh pork sausages samples collected in Porto Alegre city, Brazil

<i>Salmonella enterica</i> serovars (Serogroup)	Isolation Positive Samples	Reisolation Negative Samples	MPN.g ⁻¹ *				
			0.03 -0.1	0.1-1.0	1.0-10	10-100	460
Brandenburg (B)	14	6	3	5			
Panama (D1)	12	2	4	5		1	
Derby (B)	11	1	3	6	1		
Typhimurium (B)	8	1	4	3			
Agona (B)	6	1	2	2		1	
Infantis (C1)	5	-	2	2			2
<i>S. enterica</i> O:4,5 (B)	5	2	-	1		1	
<i>S. enterica</i> O:9,12 (D1)	4	-	2	2			
Schwarzengrund (B)	3	1	2				
Senftenberg (E4)	3	2				1	
Ohio (C1)	2	-		1	1		
Orion (E1)	2	-		2			
Cerro (K)	2	1			1		
<i>S. enterica</i> rough	2	1		1			
Münster (E1)	1	1					
<i>S. enterica</i> O:6,7 (C1)	1	-		1			
Total	81	19	22	31	3	4	2

*Most Probable Number

Table 2 Antimicrobial resistance frequency among *Salmonella* isolates from fresh pork sausages by serovars

Antimicrobial	Number of resistant isolates (%) from different				
	<i>Salmonella</i> Serovar				
	Brandenburg (n=14)	Panama (n=12)	Derby (n=11)	Typhimurium (n=8)	All other serovars (n=36)
Ampicillin	0	10 (83.0)	1 (9.1)	5 (62.5)	9 (25.0)
Chloramphenicol	1 (7.1)	9 (75.0)	2 (18.2)	3 (37.5)	10 (27.8)
Gentamicin	0	1 (8.0)	0	1 (12.5)	0
Nalidixic acid	5 (35.7)	6 (50.0)	0	4 (50.0)	5 (13.9)
Tetracycline	13 (92.9)	9 (75.0)	11 (100)	7 (87.5)	18 (50.0)
Tobramycin	0	0	0	1 (12.5)	1 (2.8)
Streptomycin	1 (7.1)	9 (75.0)	5 (45.5)	1 (12.5)	7 (19.4)
Sulfamethoxazole- trimethoprim	12 (85.7)	4 (33.0)	2 (18.2)	1 (12.5)	5 (13.9)
Sulfonamide	12 (85.7)	10 (83.0)	9 (81.8)	3 (37.5)	11 (30.6)

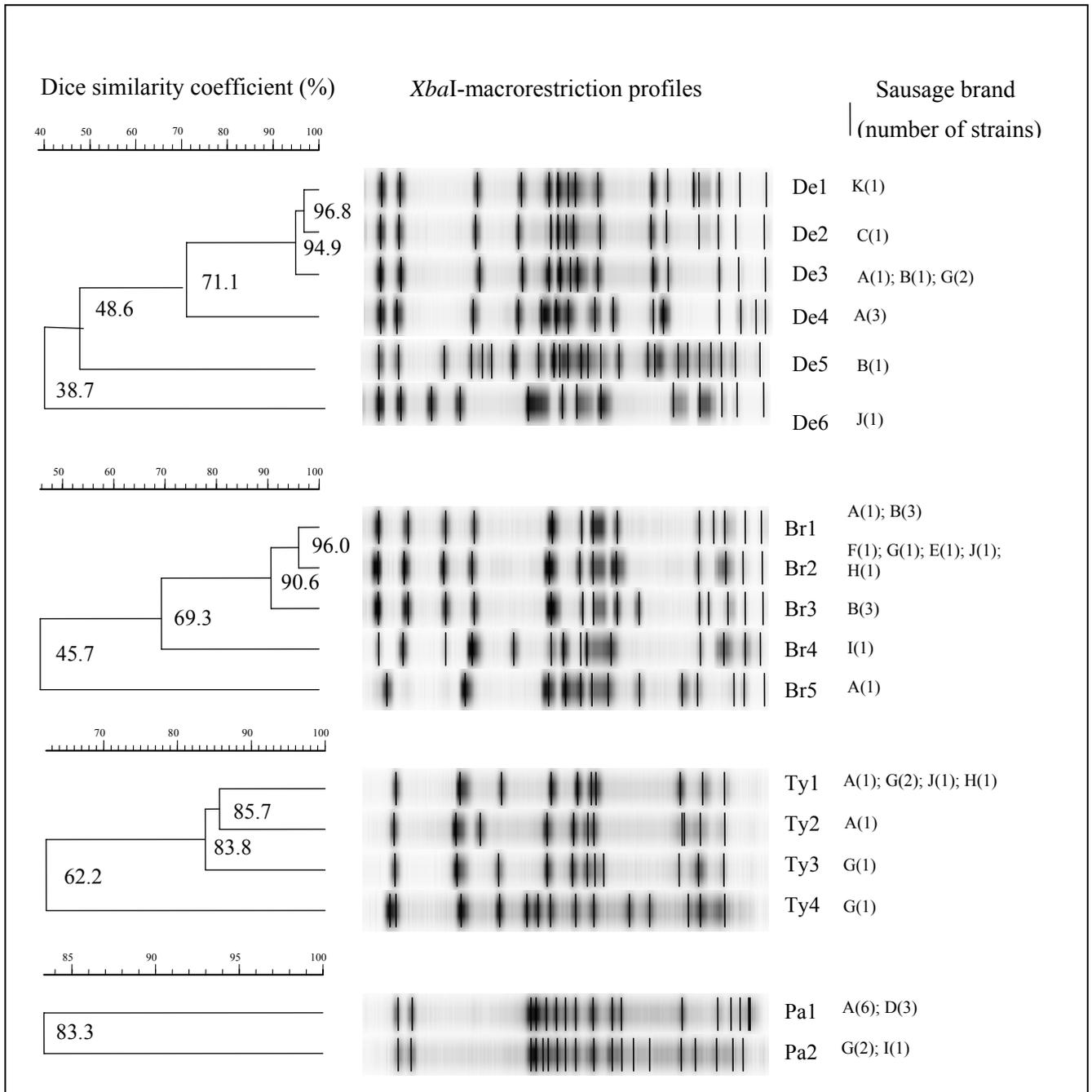


Fig. 1. *XbaI*-macrorestriction profiles identified in the most representative *Salmonella* serovars (De, *S. Derby*; Br, *S. Brandenburg*; Ty, *S. Typhimurium*; Pa, *S. Panama*) isolated from fresh pork sausage samples in Porto Alegre, Brazil. The dendrogram presents the similarity determined by Dice coefficient and UPGMA clustering.

References

- Angulo, F.J., Johnson, K.R., Tauxe, R.V., Cohen, M.L., 2000. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microbial Drug Resistance* 6, 77-83.
- BAM, 1998. Bacteriological Analytical Manual. (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html). Appendix 2: Most Probable Number Determination from Serial Dilutions. 8th edition.
- Beaudin, B.A., Brosnikoff, C.A., Grimsrud, K.M., Heffner, T.M., Rennie, R.P., Talbot, J.A., 2002. Susceptibility of human isolates of *Salmonella typhimurium* DT104 to antimicrobial agents used in human and veterinary medicine. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* 42, 17-20.
- Berends, B.R., Urlings, H.A.P., Snijders, J.M.A., Van Knapen, F., 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* in pigs. 1996. *International Journal of Food Microbiology* 30, 37-53.
- Bessa, M.C., Costa, M., Cardoso, M., 2004. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Veterinary Research* 24, 80-84.
- Bessa, M.C., Michael, G.B., Canu, N., Canal, C.W., Cardoso, M., Rabsch, W., Rubino, S. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. 2007. *Research in Veterinary Science* (in press 10.1016/j.rvsc.2007.01.006).
- Botteldoorn, N., Herman, L., Rijpens, N., Heyndrickx, M., 2004. Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. *Applied Environmental Microbiology* 70, 5305-5314.
- Boughton, C., Leonard, F.C., Egan, J., Kelly, G., O'Mahony, P., Markley, B.K., Griffin, M., 2004. Prevalence and number of *Salmonella* in Irish retail pork sausages. *Journal Food Protection* 67, 1834-1839.

- Briggs, C.E., Fratamico, P.M. 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 43, 846-849.
- Castagna, S.M.F., Schwarz, P., Canal, C.W., Cardoso, M., 2004. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. *Acta Scientiae Veterinariae* 32, 141-147.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS), 2005. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test—Eighth edition: Approved standard M2-A8, CLSI/NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Costalunga, S., Tondo, E., 2002. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology* 33, 342-346.
- Cruchaga, S., Echeita, A., Aladueña, A., García-Peña, J., Frias, N., Usera, M.A., 2001. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 315-321.
- Duffy, E.A., Belk, K.E., Sofos, J.N., Bellinger, G.R., Pape, A., Smith, G.C., 2001. Extent of microbial contamination in United States pork retail products. *Journal of Food Protection* 64, 172-178.
- Escartin, E.F., Castillo, A., Hinojosa-Puga, A., Saldaña-Lozano, J., 1999. Prevalence of *Salmonella* in chorizo and its survival under different storage temperatures. *Food Microbiology* 16, 479-486.
- Escartin, E.F., Saldaña-Lozano, J., Rodríguez, O., Martínez-González, N., Torres, J.A., 1995. Incidence and level of *Salmonella* serovars in raw pork obtained from Mexican butcher shops. *Food Microbiology* 12, 435-439.
- Escartin, E.F., Saldaña-Lozano, J., Garcia, O.R., 2000. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *International Journal of Food Microbiology* 54, 19-25.

- Geimba, M.P., Tondo, E.C., Oliveira, F.A., Canal, C.W., Brandelli, A., 2004. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *Journal of Food Protection* 67, 1229-1233.
- Giovannini, A., Prencipe, V., Conte, A., Marino, L., Petrini, A., Pomilio, F., Rizzi, V., Migliorati, G., 2004. Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. *Food Control* 15, 139-144.
- Gorman, R., Adley, C., 2004. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from human, food and animal sources in the Republic of Ireland. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2314-2316.
- Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R.V., 2002. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiology and Infection* 129, 1-8.
- Liebisch, B., Schwarz, S., 1996. Molekularbiologische Methoden zur epidemiologischen Typisierung von Salmonellen - Übersichtsreferat. *Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 109, 348-354.
- Liu, S.L., Hessel, A., Sanderson, K.E., 1993. The *XbaI-BlnI-CeuI* genomic cleavage map of *Salmonella typhimurium* LT2 determined by double digestion, end labelling and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 175, 4104-4120.
- Lourenço, M.C.S., Reis, E.F.M., Valls, R., Asensi, M.D., Hofer, E., 2004. *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* serogroup O:16 in a HIV positive patient: case report. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46, 169-170.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Disease* 5, 607-625.
- Michael, G.B., Cardoso, M., Schwarz, S., 2006. Molecular analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from slaughter pigs. *Veterinary Microbiology* 112, 43-52.

- Oliveira, C.J.B., Carvalho, L.F.O.S., Fernandes, S.A., Tavechio, A.T., Menezes, C.C.P., Domingues Jr., F.J., 2002. Antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from slaughter-age pigs and environmental samples. *Microbial Drug Resistance* 4, 407-411.
- Rabsch, W., Tschäpe, H., Bäuml, A.J., 2001. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection* 3, 237-247.
- Reij, M.W., den Aantrekker, E.D., ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force, 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology* 91, 1-11.
- Schwarz, S., Liebisch, B., 1994. Pulsed-field gel electrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vaccine strain Zoosaloral H. *Letters in Applied Microbiology* 19, 469-472.
- Sinell, H.J., Pietzsch, O., Klingbeil, H., Benner, M., 1990. Estimation of most probable number of *Salmonella* in retail samples of minced pork. *International Journal of Food Microbiology* 11, 135-142.
- Swanenburg, M., Urlings, H.A.P., Snijders, J.M.A., 2001. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology* 70, 243-254.
- Taunay, A.E., Fernandes, S.A., Tavechio, A.T., Neves, B.C., Dias, A.M.G., Irino, K., 1996. The role of public health laboratories in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 38, 119-127.
- Tavechio, A.T., Fernandes, S.A., Neves, B.C., Dias, A.M.G., Irino, K., 1996. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 38, 315-332.
- Tavechio, A.T., Ghilardi, A.C.R., Peresi, J.T.M., Fuzihara, T.O., Yonamine, E.K., Jakabi, M., Fernandes, S.A., 2002. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. *Journal of Food Protection* 65, 1041-1044.

Threlfall, E.J., Ward, L.R., Rowe, B., 1997. Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. *Euro Surveillance* 2, 81-84.

Vieira-Pinto, M., Tenreiro, R., Martins, C., 2006. Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 110, 77-84.

CAPÍTULO 3 – Crescimento e de destruição térmica de sorovares de *Salmonella* sp. isolados de lingüiça frescal de carne suína

SUBMETIDO: ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE, 2007

Crescimento e de destruição térmica de sorovares de *Salmonella* sp. isolados de lingüiça frescal de carne suína

Growth and death curves of *Salmonella* serovars isolated from fresh pork sausages

Lisandra Mürmann¹, Maria Cecília Magagnin dos Santos¹; Marisa Cardoso¹

¹ Setor de Medicina Veterinária Preventiva. UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9090. Agronomia. CEP: 91540.000. Porto Alegre/RS. Correspondência: mcardoso@ufrgs.br; Fax: 52-3308-6123.

RESUMO

Análises conduzidas em produtos de origem suína têm demonstrado a ocorrência de *Salmonella* sp. em baixas contagens. Entretanto, fatores relacionados ao armazenamento e preparo dos alimentos podem influenciar a população de *Salmonella* sp. presente no alimento, determinando que doses suficientes para causar infecção alimentar sejam alcançadas. Desta forma, para a condução de uma análise de risco, essas variáveis precisam ser estudadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de crescimento e destruição de isolados de *Salmonella* encontrados em lingüiça frescal de carne suína. Foram utilizados isolados de doze sorovares distintos de *Salmonella*, os quais após cultivados em caldo nutriente foram ajustados até uma concentração de $4 \log_{10}$ para os ensaios de crescimento e $8 \log_{10}$ para inativação térmica. Os ensaios de crescimento foram conduzidos na temperatura ambiente (22-33°C) e de refrigeração (6-11°C), enquanto a destruição térmica foi avaliada a 60°C. Após diferentes intervalos de tempo na temperatura ambiente (0-10 horas); refrigeração (0-30 dias) e temperatura de destruição (0-30 minutos) foram retiradas alíquotas e realizadas contagens pelo método de Miles-Misra. A cinética de crescimento em temperatura ambiente foi semelhante para os diferentes sorovares que permaneceram até duas horas em fase lag e, após, foi iniciada a fase exponencial. Em temperatura de refrigeração, todos os isolados apresentaram o mesmo comportamento, mantendo a contagem inicial até 30 dias. A inativação térmica total ocorreu após o tempo de 20 minutos em todos os ensaios. Os resultados obtidos neste trabalho inferem que isolados dos diferentes sorovares de *Salmonella* apresentam cinética de crescimento e de destruição térmica semelhante.

Descritores: *Salmonella*, temperatura, cinética de crescimento, cinética de destruição

ABSTRACT

Low counts of *Salmonella* sp. has been detected in assays conducted with pork products. However, storage condition and food preparation can affect *Salmonella* populations in contaminated foods, allowing the multiplication until the infectious dose level. For this reason, the aforementioned variables must be included in food risk analysis. The aim of this study was to evaluate the growth and death curves of *Salmonella* isolates from fresh pork sausages. Isolates belonging to twelve *Salmonella* serovars were grown in nutrient broth and diluted until a concentration of $4\log_{10}$ or $8\log_{10}$ for the growth assays and heat destruction test, respectively. The growth curve was determinate at room temperature (22-33°C) and under refrigeration (6-11°C), while the death curve was evaluated at 60°C. After different intervals at room temperature (0-10 h), under refrigeration (0-30 days) and at 60°C (0-30 min), aliquots were taken from each assay for bacterial enumeration using the Miles-Misra method. At room temperature, all *Salmonella* serovars started the exponential phase after a two hours period of lag phase. Under refrigeration all isolates remained with the initial population counts up to 30 days. The total heat inactivation was observed after 20 min in all assays. The results indicated that isolates belonging to the analyzed *Salmonella* serovars present similar growth and heat destruction curves.

Key words: *Salmonella*, temperature, growth curve, heat death curve

INTRODUÇÃO

Salmonella sp. é um importante contaminante de alimentos, principalmente de origem animal, e é um dos principais agentes bacterianos responsáveis por toxinfecções em muitos países [11,13]. Segundo dados da Secretaria Estadual da Saúde no Estado do Rio Grande do Sul, desde 1993, a salmonelose tem sido a doença transmitida por alimentos

de maior ocorrência [6,17]. Apesar da maioria dos surtos estar relacionada com alimentos contendo ovos [3, 17], produtos de origem suína podem ser igualmente veiculadores de *Salmonella* [2]. O risco de desenvolver salmonelose pelo consumo de um alimento é influenciado por diversos fatores, entre eles a quantidade de *Salmonella* sp. presente e práticas de armazenamento e preparo do alimento [20,3]. O binômio tempo/temperatura ao qual o alimento está exposto, associado à velocidade de crescimento do isolado bacteriano, pode determinar que o alimento contaminado, no momento da ingestão, apresente contagens de *Salmonella* sp. capazes de causar infecção [5]. Dessa forma, para a avaliação do risco que um alimento representa deve-se levar em consideração a influência de eventos que propiciem a multiplicação e a destruição da bactéria e a dose infectante presente no momento da ingestão desse alimento. Como uma das etapas para a análise desse risco, o objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento, em temperatura ambiente e de refrigeração e a inativação térmica de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça frescal de carne suína.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados isolados de doze sorovares distintos de *Salmonella* sp. (Brandenburg, Panama, Derby, Typhimurium, Agona, Senftenberg, Schwarzengrund, Infantis, Ohio, Orion, Cerro e Muenster), oriundos de lingüiça frescal suína. Alíquotas (1mL) de culturas de 24 horas em Infusão Cérebro e Coração (BHI) de cada isolado foram diluídas seriadamente em água peptonada 0,1%, em triplicata. Para os ensaios de crescimento utilizou-se a concentração de $4 \log_{10}$ e para inativação térmica $8 \log_{10}$. As amostras mantidas à temperatura ambiente (22-33°C) foram monitoradas após os tempos de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 horas. As armazenadas sob refrigeração (6-11°C) foram verificadas nos dias 0, 1, 10, 20, 30. Nos ensaios de destruição térmica em banho-maria (60°C) foram utilizados os intervalos de 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. A cada

um dos referidos tempos, alíquotas dos ensaios realizados foram semeadas, em triplicata, em Ágar Triptose de Soja (TSA), pelo método de plaqueamento em gotas [15]. Foram calculadas as médias das repetições obtidas para cada sorovar, utilizando o programa Microsoft Office Excel.

RESULTADOS

A partir da população inicial de $4 \log_{10}$, a cinética de crescimento em temperatura ambiente foi semelhante para todos os sorovares. Até duas horas todos os isolados permaneceram em fase lag e, a partir desse período, foi iniciada a fase exponencial. Nas 6 horas a contagem esteve entre $5-7 \log_{10}$ e, após 10h, foi alcançado $7-8 \log_{10}$ (Figura 1A). Em temperatura de refrigeração, os isolados de todos os sorovares mantiveram contagens iniciais até os 30 dias (Figura 1B).

Em relação aos resultados obtidos na curva de destruição térmica, a partir da população inicial de $7-8 \log_{10}$, todos os sorovares de *Salmonella* submetidos à temperatura de 60°C , foram totalmente inativados após o tempo de 20 minutos (Figura 1C).

DISCUSSÃO

Em estudos conduzidos anteriormente observou-se que baixas contagens de *Salmonella* sp. podem estar presentes em lingüiça frescal de carne suína [16]. Desta forma, o risco que esse produto oferece ao consumidor estará relacionado à existência de condições que permitam a multiplicação da bactéria no alimento. Nesse contexto, o estudo da cinética de crescimento do microrganismo é de grande importância [18] uma vez que um alimento será submetido a fatores extrínsecos variáveis que influenciarão na sua sobrevivência. Ao lado disso, o parâmetro de crescimento obtido para as populações de microrganismos pode diferir [12]. Dessa forma, para as simulações necessárias para a análise do risco que o consumo de lingüiça frescal de carne suína pode oferecer para a

ocorrência de salmonelose, os diversos sorovares de *Salmonella* encontrados nesse produto foram analisados quanto ao seu comportamento quando submetidos a diferentes temperaturas.

Em temperatura ambiente, os diferentes isolados apresentaram comportamento semelhante iniciando a multiplicação após duas horas. Tempo de duração semelhante na fase lag havia sido observado em isolados dos sorovares Enteritidis, Bredeney e Typhimurium, seguido de uma fase exponencial que durou aproximadamente 12 horas [14]. Além disso, esse período de fase lag corrobora dados anteriores [3] demonstrando que mais de 20% das toxinfecções alimentares ocorridas no Rio Grande do Sul, entre 1997 e 1999, foram causadas pelo armazenamento dos alimentos em temperatura ambiente por mais de duas horas. Também considerando que a fase lag das bactérias é curta, a RDC 216 [1] institui que produtos perecíveis devem ser expostos à temperatura ambiente somente pelo tempo mínimo necessário, a fim de não comprometer a qualidade higiênico-sanitária do alimento.

Por outro lado, quando os isolados foram mantidos em temperatura de refrigeração, como preconiza a legislação, a população de *Salmonella* manteve-se constante pelos 30 dias de observação. Em condições de baixas temperaturas, as reações químicas, a atividade enzimática e a multiplicação dos microrganismos são mais lentas, levando a um maior tempo em que os alimentos poderão ser armazenados antes do seu consumo [10,19]. Entretanto, o armazenamento sob refrigeração não resultou na diminuição das populações de *Salmonella* sp., demonstrando que, uma vez contaminado, o alimento poderá representar risco durante toda sua vida de prateleira.

A dose infectante de *Salmonella* para humanos saudáveis varia entre 10^6 e 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC), embora já tenham sido relatados casos de salmonelose com doses inferiores [9]. Neste estudo, a dose infectante foi alcançada após

período de 6-8 horas na temperatura ambiente, demonstrando que mesmo os alimentos com uma população inicial reduzida de *Salmonella*, poderão ser potenciais causadores de toxinfecção alimentar, caso tenham um armazenamento prolongado na temperatura de risco.

A maioria da população costuma consumir a lingüiça frescal após a cocção, sendo importante, para compor as simulações da análise de risco, o conhecimento da cinética de destruição do microrganismo. A população inicial adotada no estudo de destruição térmica esteve acima daquela considerada como dose infectante, bem como das contagens encontradas em amostras de lingüiça frescal [16]. Entretanto, no presente estudo simulações de armazenamento inadequado, anterior ao tratamento térmico, demonstraram o aumento expressivo da população inicial. Por conta disso, o experimento de inativação térmica partiu de um cenário mais adverso, onde as contagens iniciais teriam sido ampliadas em mais de 5 \log_{10} . Mesmo nessas condições, porém, após 20 minutos numa temperatura inferior ao preconizado pela RDC 216 [1] a ser atingida em todas as partes do alimento (70°C), houve a completa inativação de todos os isolados pertencentes aos sorovares de *Salmonella* provenientes desse tipo de alimento. Este resultado é semelhante ao encontrado para *S. Enteritidis* [14], onde uma população inicial de 6-7 \log_{10} foi destruída em 15 minutos. Porém o tempo encontrado foi superior ao reportado por outros autores para uma população de 5 \log_{10} de *S. Enteritidis* [8]. Deve-se considerar, ainda, que a condução do experimento no presente estudo em água peptonada não incluiu na simulação a proteção que a matriz do alimento pode oferecer contra a inativação térmica da bactéria. Desta forma, num próximo passo da análise de risco, a matriz do alimento deverá ser incluída na simulação.

Finalmente, mesmo considerando a destruição que a bactéria sofrerá durante o tratamento térmico do alimento, riscos como a contaminação cruzada [4,7] de outros

alimentos em contato com a mesma superfície de preparo onde esteve a lingüiça frescal contaminada, bem como a recontaminação desse alimento, após o tratamento térmico, não podem ser esquecidos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que isolados dos diferentes sorovares encontrados na lingüiça frescal suína apresentam cinética de crescimento e destruição térmica semelhantes.

REFERÊNCIAS

- 1 Brasil. 2004.** Resolução-RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. *Diário Oficial da União*, DF, 16 set.
- 2 Cantoni C., D'Aubert S., Traldi C. 1993.** Serotipi di Salmonella nell'uomo e negli alimenti nel triennio 1988-1991 in Itália. *Archivio Veterinario Italiano*, Supplementi. 44: 1-14.
- 3 Costalunga S. & Tondo E.C. 2002.** Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33:342-346.
- 4 Escartín E.F., Lozano J.S., Garcia O.R. 2000.** Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *International Journal of Food Microbiology*. 54:19-25.
- 5 Forsythe S.J. 2002.** *Microbiological Risk Assessment of Food*. USA: Blackwell publishing, 212p.
- 6 Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde. Instituto de Pesquisa Brasileira/Laboratório Central do Rio Grande do Sul (FEPPS/IPB/LACEN). 1999.** Relatório de Investigações de Surtos de Salmonelose de 1984 a 1999.

- 7 Gorman R., Bloomfield S., Adley C.C. 2002.** A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology*. 76:143-150.
- 8 Humpheson L., Adams M.R., Anderson W. A., Cole M. B. 1998.** Biphasic thermal inactivation kinetics in *Salmonella* Enteritidis PT4. *Applied Environmental Microbiology*. 64:459-464.
- 9 Humphrey T.J. 2004.** *Salmonella*, stress responses and food safety. *Science and Society*. 2: 504-509.
- 10 Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). 1996.** Relatório da medição de temperatura em freezers de supermercados. Rio de Janeiro.
- 11 Laconha I., Bagessen D.L., Rementeria A., Garaizar J. 2000.** Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. *Veterinary Microbiology*. 75:155-165.
- 12 Liu F., Yang R.Q., Li Y.F. 2006.** Correlations between growth parameters of spoilage micro-organisms and shelf-life of pork stored under air and atmosphere at -2.4 and 10°C. *Food Microbiology*. 23:578-583.
- 13 Lopalco P.L., Germinario C., Di Martino V., Frisoli L., Pagano A., Quarto M., Barbuti S. 2000.** Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella* Enteritidis epidemic. *Annali d'igiene*. 12: 279-285.
- 14 Malheiros P.S. 2007.** Avaliação da cinética de crescimento, resistência ácida e resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul e comparação com outros sorovares. 86 f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de

Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

15 Milles, A.A.L. & Misra, S.S. 1938. The estimation of the bacterial power of the blood. *Journal of Hygiene*. 38:732-749.

16 Mürmann L., Santos M.C., Cardoso M. 2005. Prevalence and level of *Salmonella enterica* in pork fresh sausages purchased in Southern Brazil. In: *Proceedings of 13S International Symposium Salmonella and Salmonellosis* (Saint-Malo, França). p. 443-444.

17 Nadvorny A., Figueiredo D.M.S., Schmidt V. 2004. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul, em 2000. *Acta Scientiae Veterinariae* . 32: 47-51.

18 Perni S., Andrew W.P., Shama G. 2005. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curve: definition is everything. *Food Microbiology*. 22:491-495.

19 Thomson J.E., Whitehead W.K., Mercuri, A.J. 1974. Chilling poultry meat- a literature review. *Poultry Science*.53:1268-1281.

20 Wegener H.C. & Bager F. 1997. Pork as a source of human salmonellosis.. In: *Proceedings of the International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, v.2. (Copenhagen, Dinamarca). p.3-8.

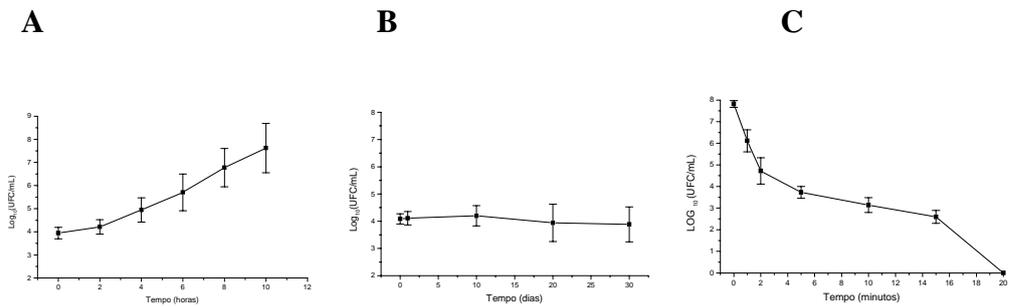


Figura 1- Curva de crescimento médio de isolados dos sorovares Brandenburg, Panama, Derby, Typhimurium, Agona, Senftenberg, Schwarzengrund, Infantis, Ohio, Orion, Cerro e Muenster de *Salmonella*, em água peptonada 0,1%, na temperatura ambiente (1A), sob refrigeração (1B) e destruição térmica (1C).

CAPÍTULO 4- Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil

SUBMETIDO: BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, 2007

Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil

Lisandra Mürmann¹, Maria Cecília dos Santos¹, Solange Mendes Longaray², Jane Mari Corrêa Both², Marisa Cardoso^{1*}

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Instituto de Pesquisas Biológicas- Laboratório Central do Estado, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Secretaria Estadual da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/RS)

*Corresponding Author: Marisa Cardoso, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 90540-000. Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55-51-3308-6123,

Fax: +55-51-3308-7305.

E-mail address: mcardoso@ufrgs.br

ABSTRACT

Data concerning the prevalence and populations of *Salmonella* in foods implicated in outbreaks may be important to the development of quantitative microbial risk assessments. In this sense, the objective of the present study was to assess the amount of *Salmonella* sp. in different foods implicated in foodborne outbreaks in Rio Grande do Sul and to characterize the isolated strains using phenotypic and genotypic methods. Nineteen food samples involved in ten foodborne outbreaks occurred in 2005, and positive on *Salmonella* isolation at the Central Laboratory of the Health Department of the State of Rio Grande do Sul, were included in this study. Food samples were submitted to estimation of *Salmonella* using the Most Probable Number (MPN) technique. Moreover, one confirmed *Salmonella* colony of each food sample was serotyped, characterized by *Xba*I-macrorestriction profile, and submitted to antimicrobial susceptibility testing. Foods containing eggs, mayonnaise or chicken were contaminated with *Salmonella* in eight outbreaks. Higher counts ($>10^7$ MPN.g⁻¹) of *Salmonella* were detected mostly in foods containing mayonnaise. The isolation of *Salmonella* from multiple food items in five outbreaks probably resulted from the cross-contamination, and the high *Salmonella* counts detected in almost all analyzed samples probably resulted from storing in inadequate temperature. All strains were identified as *S. Enteritidis*, and presented a unique macrorestriction profile, demonstrating the predominance of one clonal group in foods involved in the salmonellosis outbreaks. A low frequency of antimicrobial resistant *S. Enteritidis* strains was observed and nalidixic acid was the only resistance marker detected.

Key words: *Salmonella*, foodborne outbreak, quantification, PFGE.

INTRODUCTION

In Southern Brazil, a high prevalence of *Salmonella* isolation has been found in pigs (2), pork (6) and pork products (24). In opposite to that, pork is rarely involved in salmonellosis outbreaks reported in this region (8, 25). Data collected in Rio Grande do Sul, a State located in Southern Brazil, during the period of 1997 to 1999, pointed salad prepared with homemade mayonnaise as the most often implicated in salmonellosis outbreaks, accounting for 42.45% of all identified food vehicles (8). Factors responsible for the discrepancy between *Salmonella* prevalence in pork and the frequency of foodborne outbreaks attributed to pork consumption need to be better investigated.

It is well documented that exposure to larger quantities of foodborne pathogens usually results in a greater risk to human health (14, 32). Consequently, the final concentration of *Salmonella* in food is an important parameter contributing to overall disease risk. In this sense, data on the prevalence and populations of *Salmonella* in foods implicated in outbreaks may be important to the development of quantitative microbial risk assessments.

Another aspect contributing to the understanding of *Salmonella* epidemiology is the characterization of the strains involved in outbreaks. Serotyping is traditionally conducted as a first approach in the characterization and usually forms the background for all other typing methods (27). Over the past two decades genotyping has been associated to the traditional typing methods to achieve a better discrimination of strains and to identify bacterial clones (27). Among the molecular methods, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is considered the standard method for DNA fingerprinting in *Salmonella*, and has been performed to investigate salmonellosis outbreaks (17, 21).

Based on this, the objective of the present study was to assess the amount of *Salmonella* sp. in different foods implicated in foodborne outbreaks in Rio Grande do Sul and to characterize the isolated strains using phenotypic and genotypic methods.

MATERIAL AND METHODS

Food samples

Nineteen food samples involved in ten food-borne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul in 2005, and positive on *Salmonella* isolation at the Central Laboratory of the Health Department of the State of Rio Grande do Sul (LACEN/RS) were included in this study. Food samples were stored during the analysis period in sterile flasks at 4°C. Data available for each confirmed salmonellosis outbreak were obtained from the epidemiological investigation report received with the food samples by LACEN.

***Salmonella* quantification**

Food samples were submitted to estimation of *Salmonella* using the Most Probable Number (MPN) technique. From each positive sample, 25 g were added to 225 mL of Buffered Peptone Water (BPW, Merck, Darmstadt, Germany). The samples were homogenized for 1 min (Stomacher, Interscience) and decimal dilutions up to 10⁻⁸ were prepared in BPW. Triplicate tubes of all dilutions were incubated at 35 °C for 18 h. From each dilution tube, aliquots of 0.1 ml were transferred to 9.9 ml of Rappaport-Vassiliadis broth (Merck). Following incubation on the selective enrichment media at 42°C for 24 h, samples were streaked onto XLT4 agar (Difco). After 24 h incubation at 37°C, suspected colonies from each plate were confirmed as *Salmonella* by biochemical tests and agglutination using poly O-antiserum (Probac). One confirmed *Salmonella* colony of each food sample was serotyped at the Brazilian *Salmonella* Reference Institute (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil). The number of tubes in each

dilution, from which colonies were confirmed as *Salmonella*, was used to estimate *Salmonella* quantification using the MPN table (1).

Macrorestriction analysis

Genomic DNA of one *Salmonella* isolate obtained from each positive food sample was prepared as previously described (22, 34). Slices of DNA-containing agarose plugs were digested with 20 units of *Xba*I (Promega, Madison, WI, USA) at 37°C for 18 h. The respective fragments were separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in 1% PFGE-certified Agarose gel (BioRad, Hercules, CA, USA) in a CHEF DR II system (BioRad, California, USA) at 5.6 V/cm with 0.5× TBE as the running buffer. In order to avoid the DNA degradation of *Salmonella* isolates, 50 µm of Thiourea (Acros Organics, Geel, Belgium) was added to the running buffer. The pulse times were increased from 10 to 30 s during the first 11 h and subsequently from 30 to 50 s during the next 13 h. The gel was stained with ethidium bromide (2 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) and photographed under UV-illumination. Patterns produced by PFGE were compared using the GelCompar II software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial resistance was determined by agar disk diffusion tests using disks with the following antimicrobials (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brazil): amikacin (30 µg), ampicillin (10 µg), cefaclor (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), tetracycline (30 µg), tobramycin (10 µg), streptomycin (10 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg), and sulfonamide (300 µg). The testing was conducted and evaluated according to the document M2-A8 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (7). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as control.

RESULTS

In eight salmonellosis outbreaks analyzed in the present study, a total of 212 people were exposed and 15 patients needed hospitalization. In two outbreaks, epidemiological data regarding the city of origin or the number of exposed people were not available. The major symptoms observed were fever, diarrhea and abdominal pain, while nausea and vomiting were reported in six outbreaks. The median incubation period varied from 9 to 24 hours, and in the majority of the outbreaks, symptoms appeared between 13 and 17 hours after the food ingestion.

Foods containing eggs, mayonnaise or chicken were contaminated with *Salmonella* in eight outbreaks (Table 1). Higher counts ($>10^7$ MPN.g⁻¹) of *Salmonella* were detected mostly in foods containing mayonnaise. Other food items with high counts were the cake in outbreak #8, and the pork sausage in outbreak #4. In five outbreaks more than one food item were positive on *Salmonella* isolation. In these cases, food items with low as well as high *Salmonella* counts were detected in a same outbreak.

All fourteen *Salmonella* strains submitted to serotyping were classified as *S. Enteritidis* and resulted in a single PFGE profile (Figure 1). Six *S. Enteritidis* strains were resistant only to nalidixic acid, while the remaining eight strains were sensible to all tested antimicrobials.

DISCUSSION

In the present study we analyzed foods collected in ten confirmed salmonellosis outbreaks investigated in Rio Grande do Sul in the year 2005. These outbreaks probably represent a small fraction of all salmonellosis cases that occurred in this region, since the lack of reporting to the sanitary authority and failure on identification of the responsible food is not a rare event in foodborne disease surveillance (33).

Salmonellosis has been the most important foodborne disease, in Rio Grande do Sul, since 1993 (8, 25). In most salmonellosis outbreaks investigated in Brazil (8, 25, 29) and in other countries (3, 28), foods prepared with eggs were implicated as the *Salmonella* vehicle. Similarly, in the present study mayonnaise and cakes are among the foods with *Salmonella* isolation in six outbreaks, and together with chicken were implicated in all except two outbreaks analyzed. In contrast to that, only in outbreak #4 *Salmonella* was isolated from pork and pork sausage. However, *Salmonella* has been frequently isolated from pigs and pork (2, 6, 24), demonstrating that this pathogen circulates throughout the swine production chain. Possible reasons for these conflicting results are the low *Salmonella* counts found in pork products sampled in Rio Grande do Sul (24), and the habit of preparing pork products well-done, allowing the destruction of any *Salmonella* that is present in the food.

The isolation of *Salmonella* from multiple food items in five outbreaks demonstrated the cross-contamination due to improper manipulation. Moreover, the high *Salmonella* counts detected in almost all analyzed samples probably resulted from temperature abuse by holding foods at ambient temperature for more than two hours or by their inadequate refrigeration. This kind of processing failures has been commonly pointed among the factors contributing for salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul (8, 25). The association of cross-contamination and temperature abuse can explain the *Salmonella* counts found on the cooked beet and on the cooked peas in outbreaks #2 and #9, respectively. In both outbreaks, animal derived products were also involved, thus the contact with raw animal-derived foods as well as with contaminated surfaces in the kitchen may have allowed the cross-contamination of the cooked foods. Afterwards, the holding of the contaminated cooked foods at ambient temperature permitted the

multiplication of *Salmonella*, which attained high population counts prior the consumption.

The number of involved people in an outbreak and the severity of the symptoms are related to susceptibility of the individuals (37), food composition and *Salmonella* number on the food (13). Moreover, persons who had eaten higher amounts of contaminated foods were found more likely to have shorter incubation periods and higher hospitalization risk (14). Considering that an infecting dose between 10^5 and 10^7 colony formation units (CFU) is usually accepted for immunocompetent adults (37), most foods analyzed in the present study had *Salmonella* counts above the proposed infecting dose.

All *Salmonella* strains analyzed were serotyped as Enteritidis, demonstrating the predominance of this serovar in foods involved in salmonellosis outbreaks occurring in Rio Grande do Sul in the year 2005. Previous studies reported that *S. Enteritidis* has become the main cause of salmonellosis outbreaks (9, 10, 12, 29) and this serovar has been also the most prevalent among poultry-related samples in Brazil (36). Furthermore, a high adaptation of *S. Enteritidis* to colonize the chicken oviduct has been proposed, indicating that poultry may be an important reservoir of this pathogen (20).

In spite of being isolated from not related outbreaks, all strains characterized in this study presented a common PFGE pulse-type, demonstrating a clonal relationship among them. In a previous study conducted in Rio Grande do Sul (38), strains isolated from poultry and humans have also demonstrated a clonal relationship. Since strains from poultry were reported as clonal due to the possible spread of one clone by international trade of breeding lines (30), a common clone causing foodborne outbreaks transmitted by egg products is not unexpectedly. Moreover, predominant PFGE patterns are also found in strains isolated from outbreaks in other countries (17) indicating that

common clones may be responsible for the disease cases. Such results reinforce the limited diversity of *S. Enteritidis* strains, and point to the need of further studies to investigate other characteristics of these clones such as survival and colonization capability.

A low frequency of antimicrobial resistant *S. Enteritidis* strains was observed and nalidixic acid was the only resistance marker detected. A shift in the resistance level was observed in *S. Enteritidis* strains isolated in the same region over time (5, 26, 38). In general, antimicrobial resistance was higher in samples of animal origin than those related to food products, demonstrating the high selective pressure caused by the use of antimicrobials in the food production chain. However, also in poultry samples a reduction on the frequency of resistant strains could be found after 1998, when many antimicrobials were banished for growth promotion in Brazil (38). The reduction of antimicrobial use occurred in the poultry production chain in recent year may explain the low frequency of resistance that we found in our study.

On the other hand, the resistance to nalidixic acid reflects the still widespread use of this antimicrobial in poultry therapy in Brazil and other countries. It is a matter of concern, since emergence of resistance to nalidixic acid has been associated to decreased susceptibility to fluoroquinolones, which are used for treatment of human patients suffering of severe salmonellosis cases (15). The prevalence of these strains in foods involved in outbreaks represents a risk of salmonellosis cases caused by strains resistant to the drug used in therapy.

In conclusion, high counts ($>10^3$ MPN.g⁻¹) of *Salmonella* were detected in most foods implicated in the reported salmonellosis outbreaks occurred in 2005 in Rio Grande do Sul. Our results suggest that one PFGE clonal group of *S. Enteritidis* was involved in all those salmonellosis outbreaks.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to Beatriz M. Falavigna (Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil) for stereotyping the *Salmonella* strains. This study was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq (L. Mürmann scholarship).

REFERENCES

1. BAM, 1998. Bacteriological Analytical Manual. (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html). Appendix 2: Most Probable Number Determination from Serial Dilutions. 8th edition.
2. Bessa, M.C.; Costa, M.; Cardoso, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. *Braz. J. Vet. Res.*, 24: 80-84, 2004.
3. Bonner, C.; Foley, B.; Wall, P.; Fitzgerald, M. Analysis of outbreaks of infectious intestinal disease in Ireland 1998 and 1999. *Irish Med. J.*, 94:142-144, 2001.
4. Borowsky, L.; Schmidt, V.; Cardoso, M. Estimation of most probable number of *Salmonella* in minced pork samples. *Braz. J. Microbiol.*, 38: 544-546, 2007.
5. Cardoso, M.O.; Ribeiro, A.R.; Santos, L.R.; Pilotto, F.; Moraes, H. L.S.; Salle, C.T.P.; Rocha, S.L.S.; Nascimento, V.P. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Braz. J. Microbiol.*, 37:368-371, 2006.
6. Castagna, S.M.F.; Schwarz, P.; Canal, C.W.; Cardoso, M. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. *Acta Sci. Vet.*, 32: 141-147, 2004.

7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS), 2005. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test – Eighth edition: Approved standard M2-A8, CLSI/NCCLS, Wayne, PA, USA.
8. Costalunga, S.; Tondo, E. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. *Braz. J. Microbiol.*, 33: 342-346, 2002.
9. Fantasia, M.; Filetici, E. *Salmonella enteritidis* in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 21:7-13, 1994.
10. Fernandes, S.A.; Ghilardi, A.C.R.; Tavechio, A.T.; Machado, A.M.O.; Pignatari, A.C.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 45(2): 59-63, 2003.
11. Gebreyes, W.A.; Altier, C. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 2813-22, 2002.
12. Geimba, M.P.; Tondo, E.C.; Oliveira, F.A.; Canal, C.W.; Brandelli, A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *J. Food Prot.*, 67, 1229-1233, 2004.
13. Glynn J.R.; Bradley, D.J. The relationship between infecting dose and severity of disease in reported outbreaks of *Salmonella* infection. *Epidemiol. Infect.*, 109 (3): 371-88, 1992.
14. Glynn, J.R.; Palmer, S.R. Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence from *Salmonella* outbreak. *Am. J. Epidemiol.*, 136(11): 1369-77, 1992.
15. Gorman, R.; Adley, C. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from human, food and animal sources in the Republic of Ireland. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 2314-2316, 2004.

16. Gudmundsdottir, S.; Hardardottir, H.; Gunnarson, E. Subtyping of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium outbreak strains isolated from humans and animals in Iceland. *J. Clin. Microbiol.*, 23, 4833-4835, 2003.
17. Haeghebaert, S.; Sulem, P.; Deroudille, L.; Vanneroy-Adenot, E.; Bagnis, O.; Bouvet, P.; Grimont, F.; Brisabois, A.; Le Querrec, F.; Hervy, C.; Espié, E.; Valk, H.; Vaillant, V. Two outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 8 linked to the consumption of Chantal cheese made with raw milk, France, 2001. *Eurosurv.*, 8 (7-8): 151-156, 2003.
18. Holcomb, D.L.; Smith, M.A.; Ware, G.O.; Hung, Y.C.; Brackett, R.E.; Doyle, M.P. Comparison of six dose-response models for use with food-borne pathogens. *Risk Anal.*, 19: 1091-1100, 1999.
19. Hurd, H.S.; Gailey, J.K.; McKean, J.D.; Rostagno, M.H. Rapid infection in market-weight swine following exposure to *Salmonella typhimurium*-contaminated environment. *Am. J. Vet. Res.*, 62, 1194-1197, 2001.
20. Kimura, A.C.; Reddy, V.; Marcus, R. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clin. Infect. Dis.*, 38: S244-S252, 2004.
21. Liebana, E.; Garcia-Migura, L.; Clouting, C.; Clifton-Hadley, F. A.; Lindsay, E.; Threlfall, E. J., McDowell, W. J.; Davies, R.H. Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England Wales, and Northern Ireland. *J. Clin. Microbiol.*, 40 (2): 4450-4456, 2002.

22. Liebisch, B.; Schwarz, S.. Molekularbiologische Methoden zur epidemiologischen Typisierung von Salmonellen - Übersichtsreferat. *Berl. Münch. Tierärz. Wochensch.*, 109: 348-354, 1996.
23. Mead, P.S.; Slutsker, L.; Dietz, V.; McCaig, L.F.; Bresee, J.S.; Shapiro, C.; Griffin, P.M.; Tauxe, R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emer. Infect. Dis.*, 5: 607-625, 1999.
24. Mürmann, L.; Santos, M. C.; Cardoso, M. *Prevalence and level of Salmonella enterica in fresh pork sausages purchased in southern Brazil*. 13 International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis, St. Malo, França, 2006, p. 443-444.
25. Nadvorny , A.; Figueiredo, D.M.S.; Schmidt, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. *Acta Sci. Vet.*, 32 (1): 47-51, 2004.
26. Oliveira, S.D.; Flores, F.S.; Santos, L.R.; Brandelli, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *Int J. Food Microbiol.*, 97:297-305, 2005.
27. Olsen, J.E.; Brown, D.J.; Skov, M.N.; Christensen, J.P. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. *Vet. Quart.*, 15: 125-135, 1993.
28. Olsen, S.J.; MacKinnon, L.C.; Goulding, J.S.; Bean, N.H.; Slutsker, L. Surveillance of food-borne disease outbreaks-United States, 1993-1997. *CDC Surv. Summ.*, 49: 1-62, 2000.
29. Peresi, J.T.M.; Almeida, I.A.Z.Z.C.; Lima, S.I.; Marques, D.F.; Rodrigues, E.C.A.; Fernandes, S.A.; Gelli, D.S.; Irino, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Rev. Saúde Pública*, 32: 477-483, 1998.

30. Rabsch, W.; Tschäpe, H.; Bäumlner, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems *Microbes Infect.*, 3: 237-247, 2001.
31. Rodrigue, D.C.; Tauxe, R.V.; Rowe, B. International increase of *Salmonella* Enteritidis: a new pandemic? *Epidemiol. Infect.*, 105:21-27, 1990.
32. Rose, J.B.; Haas, C.N.; Gerba, C.P. Linking microbiological criteria for foods with quantitative risk assessment. *J. Food Safety*, 15: 121-132, 1995.
33. Schlundt, J. New directions in foodborne disease prevention. *Int.J.Food Microbiol.*, 78:3-17, 2002.
34. Schwarz, S.; Liebisch, B. Pulsed-field gel eletrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vaccine strain Zoosaloral H. *Lett. Appl. Microbiol.*, 19: 469-472, 1994.
35. Swanenburg, M.; Urlings, H.A.P.; Snijders, J.M.A. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.*, 70: 243–254, 2001.
36. Tavechio, A.T.; Ghilardi, A.C.R.; Peresi, J.T.M.; Fuzihara, T.O.; Yonamine, E.K.; Jakabi, M.; Fernandes, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. *J. Food Prot.*, 65, 1041-1044, 2002.
37. Varnam, A H. *Foodborne pathogens: an ilustrated text*. Aylesbury:Wolfe, 1991. p.51-462.
38. Vaz, C.S.L. Determinação da diversidade fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* subsp. enterica sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007, 133 p. (PhD Thesis, Faculdade de Veterinária, UFRGS).
39. Vieira-Pinto, M.; Tenreiro, R.; Martins, C. Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, 110: 77-84, 2006.

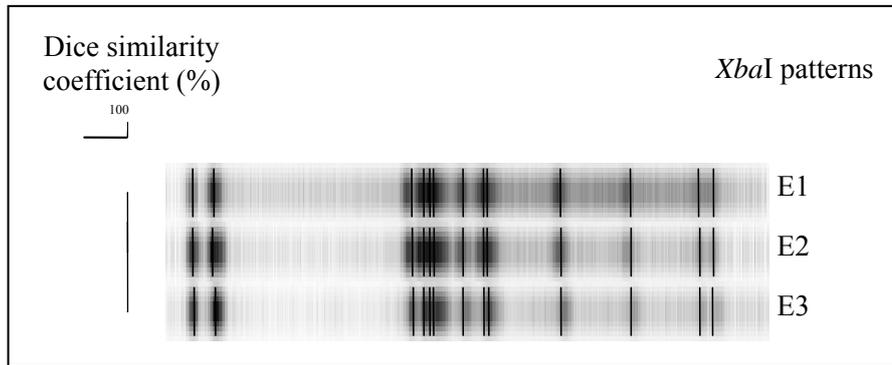


Figure 1: *Xba*I-macrorestriction profiles identified in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from foods involved in outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil.

Table 1: *Salmonella* quantification in foods involved in outbreaks that occurred in Rio Grande do Sul, Brazil, in 2005.

Outbreak #	City	Date (month/day)	Number of exposed	Number of hospitalizations	Involved food	<i>Salmonella</i> serovar	<i>Salmonella</i> quantification MPN.g ⁻¹
1	Alecrim	01/24	5	0	Potatoes with mayonnaise	Enteritidis	4.6x10 ⁹
2	Camaquã	02/21	5	0	Chicken	Enteritidis	1.1 x10 ⁵
3	Frederico Westphalen	04/19	10	0	Cooked beet	Enteritidis	2.4x10 ⁶
4	Teutônia	04/23	9	1	Cake	Enteritidis	2.4x10 ⁵
5	Ipê	04/25	6	3	Potatoes with mayonnaise	Enteritidis	2.4x10 ⁷
					Sausage	Enteritidis	3.6x10 ⁷
					Chicken	Enteritidis	4.6x10 ⁶
					Pork	ND	<3
					Cassava with mayonnaise	Enteritidis	2.8x10 ⁸
6	ND	05/15	ND	ND	Roasted beef	Enteritidis	4.3x10 ³
					Turkey	ND	<3
					Chicken	ND	<3
7	São Pedro da Serra	10/16	160	3	Roasted beef	Enteritidis	4.6x10 ⁵
8	Santa Rosa	11/27	ND	ND	Potatoes with mayonnaise	Enteritidis	1.1x10 ⁸
9	Palmeira das Missões	11/27	15	8	Cake	Enteritidis	1.5x10 ⁸
10	Porto Alegre	12/28	2	0	Cooked pea	Enteritidis	1.1x10 ³
					Minced meat	Enteritidis	3x10 ²
					Tomato	ND	<3
					Salami	ND	<3

ND- Not Determinated

RESUMO

Quantificação e perfil molecular de *Salmonella* isolada de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose no Rio Grande do Sul

Dados sobre a prevalência e a população de *Salmonella* em alimentos implicados em surtos podem contribuir na condução de análises de risco. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi determinar a quantidade de *Salmonella* sp. presente em alimentos implicados em surtos ocorridos no Rio Grande do Sul e caracterizar os isolados por meio de técnicas fenotípicas e genotípicas. Dezenove amostras de alimentos obtidos em dez surtos ocorridos em 2005 e identificados como positivos para *Salmonella* no Laboratório Central da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul foram incluídos no estudo. A quantificação de *Salmonella* foi feita pela técnica do Número Mais Provável (NPM). Ao lado disto, uma colônia de *Salmonella* obtida de cada amostra de alimento foi submetida à sorotipificação, macro-restrição com *Xba*-I e determinação de resistência a antimicrobianos. Alimentos a base de ovos, maionese e frango tiveram presença de *Salmonella* em oito surtos. As contagens mais elevadas ($>10^7$ NMP.g⁻¹) foram detectadas principalmente em alimentos contendo maionese. O isolamento de *Salmonella* de vários alimentos em cinco surtos resultou provavelmente da contaminação cruzada, enquanto as elevadas contagens encontradas, em quase todos os alimentos, podem ser explicadas por armazenamento em temperatura inadequada. Todos os isolados foram identificados como *S. Enteritidis*, e apenas um perfil foi encontrado na macro-restrição, demonstrando a predominância de um grupo clonal desse sorovar nos surtos de salmonelose. Uma baixa frequência de isolados resistentes à antimicrobianos foi encontrada, sendo a resistência ao ácido nalidíxico o único perfil encontrado.

Palavras-chave: *Salmonella*, surtos, quantificação, PFGE

CAPÍTULO 5- Análise de risco quantitativa da presença de *Salmonella* sp. em lingüiça frescal suína em Porto Alegre/RS

Artigo não submetido

Análise de risco quantitativa da presença de *Salmonella* sp. em lingüiça frescal suína

Lisandra Mürmann¹, Maria Cecília Magagnin dos Santos¹; Alexandre Ávila Collor¹; Luis Gustavo Corbellini¹; Marisa Cardoso¹

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

Salmonella é uma das causas mais freqüentes de surtos alimentares em todo o mundo. Uma das formas de transmissão de *Salmonella* sp. ao homem ocorre pela ingestão de produtos de origem animal contaminados. Os fatores que podem contribuir para a probabilidade da ocorrência de doença causada por um dado microrganismo transmitido por determinado alimento são avaliados através da análise de risco. Foram utilizados dados referentes a 336 amostras de embutidos, do tipo lingüiça frescal suína, comercializadas no varejo da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Cada amostra foi submetida ao protocolo de isolamento e de estimativa do número mais provável (NMP) de *Salmonella*. A estimativa de freqüência de consumo do embutido foi obtida através da aplicação de questionário a 424 entrevistados, os quais geraram dados de probabilidade de exposição. Para a avaliação de resistência térmica uma amostra de *Salmonella* Typhimurium foi inoculada em unidades do produto (10 unidades para cada tempo), que foram colocadas em forno pré-aquecido em 200°C. As quantidades de bactérias presentes foram mensuradas nos seguintes tempos: 0, 5, 10 e 15 minutos. O modelo utilizado para análise foi o recomendado pela Organização Mundial para Saúde Animal – OIE. Para a quantificação dos riscos, foram aplicadas distribuições de probabilidade que se adequassem a cada variável avaliada. Das 336 amostras analisadas, 82 (24,4%) foram positivas para *Salmonella* com níveis de *Salmonella* encontrados variaram de 0.03 a 460 NMP/g. A maioria dos entrevistados (87,5%) declarou que costumava ingerir lingüiça frescal, sendo que 36% dos entrevistados ingerem uma unidade por refeição. Após 15 minutos de cozimento as bactérias inoculadas no produto foram destruídas. O risco da população apresentar salmonelose devido à ingestão de lingüiça frescal suína, aquecendo por pelo menos 15 minutos, é de $6,12 \times 10^{-7}$. A cada 10.000 refeições nos diferentes intervalos de tempo de aquecimento obteve-se, para o cozimento de 5, 10 e 15 minutos uma média de 400,07; 258,64 e 0,01 casos de doença, respectivamente. Em relação ao número de churrascos a média de casos de doenças por mês foi de 2,05. Conclui-se que o risco de salmonelose pela ingestão de lingüiça frescal suína é muito baixo quando observado o tratamento térmico adequado do produto.

INTRODUÇÃO

Salmonella é uma das causas mais frequentes de surtos alimentares em todo o mundo (BEMRAH et al., 2003). No Estado do Rio Grande do Sul, desde 1993, a salmonelose tem sido a Doença Transmitida por Alimentos (DTA) de maior ocorrência, segundo dados da Secretaria Estadual da Saúde (FEPPS/IPB/LACEN, 1999).

A transmissão de *Salmonella* sp. ao homem ocorre, mais frequentemente, pela ingestão de produtos de origem animal contaminados (WEGENER & BAGER, 1997), o que pode resultar em toxinfecções alimentares (LEITÃO, 1988). Febre, náuseas, às vezes vômito, dores abdominais e diarreia caracterizam a salmonelose humana (BEMRAH et al., 2003).

Embora os produtos derivados de frangos sejam as causas mais comuns de surtos (SCUDERI; SQUARCIONE; GRECO, 1993; MEAD et al., 1999; COSTALUNGA & TONDO, 2002), a transmissão por produtos suínos também é comum (CANTONI; D'AUBERT; TRALDI, 1993; WEGENER & BAGER, 1997). Surtos devido a lingüiças contaminadas têm sido relatados nos Estados Unidos, onde a *S. Typhimurium* foi isolada (SAUER et al., 1997). Na Itália, a *Salmonella* tem sido isolada de lingüiças de carne de suínos e também em curados (GIOVANNINI et al., 2004). Em outros países, inclusive o Brasil, a *Salmonella* tem sido encontrada em produtos suínos (CHAVES et al., 2000; MÜRMAN; SANTOS; CARDOSO, 2005).

Os fatores que podem contribuir para aumentar ou reduzir a probabilidade da ocorrência de doenças causadas por um dado microrganismo transmitido por determinado alimento são avaliados através da análise de risco. A partir disso, é possível supor que a avaliação de risco pode ser uma ferramenta valiosa para levantar hipóteses a respeito da discrepância que tem sido observada entre dados de prevalência de *Salmonella* encontrada em suínos e a implicação de seus produtos em surtos de DTA.

A análise de risco é um processo que objetiva estimar a probabilidade de uma doença ocorrer em uma dada população e entender os fatores que influenciam nos riscos. É um processo ordenado que envolve gestores e avaliadores de risco e que tem a finalidade de obter as bases científicas para dimensionar o risco, avaliar as medidas sanitárias e facilitar a opção das formas de controle (FORSYTHE, 2002; PAS, 2004). Para estimar o risco são necessárias várias informações, cuja síntese conduz ao risco estimado. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estimar o risco de infecção alimentar em uma dada população pelo consumo de lingüiça frescal suína.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Estimativa da frequência e quantificação de *Salmonella* em lingüiça frescal suína:

O resultados da análise de 336 amostras de embutidos, do tipo lingüiça frescal suína, comercializadas no varejo da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul foram provenientes de estudo anterior (MÜRMAN; SANTOS; CARDOSO, 2005). Neste estudo, cada amostra foi submetida ao protocolo de isolamento de *Salmonella* descrito por Michael et al. (2003). As amostras de embutidos em que se isolou *Salmonella* foram submetidas ao protocolo testado por Borowsky, Schmidt e Cardoso (2007) com modificações, para estimativa do número mais provável (NMP) de bactérias.

2- Perfil de consumo de lingüiça frescal suína em Porto Alegre-RS

A estimativa de frequência de consumo do embutido foi obtida através da aplicação de um questionário epidemiológico (Apêndice 3). O tamanho da amostra foi calculado utilizando uma precisão de 5% (BARBETTA, 2006). Ao todo, foram 424 entrevistados escolhidos aleatoriamente que responderam questões diretas, as quais contribuíram para a identificação do perfil do consumidor, gerando dados de probabilidade de exposição. O local escolhido para as entrevistas foi considerado representativo da população de Porto Alegre, uma vez que vários estratos socioeconômicos e de faixa etária freqüentam este local.

3- Resistência térmica

Para esta etapa foi selecionada uma amostra de *Salmonella* Typhimurium oriunda de lingüiça frescal suína. Unidades individuais do produto foram utilizadas e em cada uma destas foi inoculado um volume de 500 µL de BHI contendo aproximadamente 10^6 UFC deste isolado. As unidades de embutidos inoculadas foram colocadas em um forno pré-aquecido por vinte minutos em 200°C. As quantidades de bactérias presentes nestas amostras foram mensuradas nos seguintes tempos: 0, 5, 10 e 15 minutos, utilizando-se 10 unidades para cada tempo.

4- Estimativa do risco

4.1. Distribuição das variáveis

O modelo utilizado para análise foi o recomendado pela Organização Mundial para Saúde Animal - OIE (MURRAY et al., 2006). Os caminhos de risco foram representados através da construção de um algoritmo (Figura 1), ou árvore decisória, que ilustra de maneira lógica o processo de introdução e exposição à *Salmonella* na população estudada.

Para a quantificação dos riscos, foram aplicadas distribuições de probabilidade que se adequassem a cada variável avaliada (Tabela 1). A distribuição Beta ($x + 1, n - x + 1$) foi utilizada para estimar a probabilidade p de *Salmonella* na lingüiça frescal, onde x significa o número de isolados e n o número de amostras.

Para a modelagem do NMP, a distribuição considerada mais adequada para obtenção do valor mais provável foi a cumulativa (mínimo, máximo, x_i, p_i). Os valores mínimos e máximos representam a menor e maior quantidade de NMP, respectivamente, e x_i abrange todos os valores de NMP encontrado nas amostras e p_i representa a probabilidade cumulada. A quantidade de bactéria presente na unidade do produto foi calculada através da distribuição Poisson ($\lambda \times t$), onde λ é o valor mais provável obtido pela distribuição cumulativa e t é a medida por grama.

O valor D , que é o tempo em minutos necessário para reduzir a população microbiana por um fator de 10 foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$D = t / (\log A - \log B), \quad (1)$$

onde o valor t é o tempo de aquecimento em minutos, A é o número inicial de microrganismos e B é o número de microrganismos ao final do intervalo de tempo.

Para efeito de comparação entre as diferentes fases de tratamento térmico, usou-se o valor de D para o cálculo da eficiência de cozimento (E_c), que representa a redução decimal da carga microbiana resultante de cada fase da operação. Foi utilizada a seguinte equação:

$$E_c = (t_f - t_i) / D, \quad (2)$$

onde: D = tempo de redução decimal; t_f = tempo final; t_i = tempo inicial

Foi, então, calculada a concentração resultante (CR) após cada intervalo de cozimento através da equação abaixo, conforme Bemrah et al. (2003):

$$CR(t_i) = CR_{i-5} / 10^{E_{ci}}, \quad i = 5, 10, 15 \quad (3)$$

4.2. Descrição do modelo

A descrição do modelo encontra-se na tabela 2.

4.2.1. Utilizando os dados das variáveis anteriormente obtidas, calcularam-se as probabilidades de infecção (PI) através da distribuição Beta–Poisson, conforme Rose, Haas e Regli (1991). A seguinte equação descreve a distribuição utilizada:

$$PI = 1 - (1 + d/\beta)^{-\alpha}, \quad (4)$$

onde $\alpha = 0,33$ e $\beta = 139,9$, de acordo com ROSE & GERBA (1991).

4.2.2. A probabilidade de doença (PD) foi estimada através da distribuição Pert, que utiliza um valor mínimo, mais provável e máximo de casos de doença após a ingestão de alimento contaminado. Esses valores foram obtidos com base em dados da literatura (McCULLOUGH & EISELE, 1951), conforme tabela 2.

4.2.3. O risco individual de apresentar doença ingerindo uma unidade de lingüiça frescal suína contaminada está condicionado a frequência (Fr) de contaminação do produto, PI e PD, que é dado por:

$$RD = Fr \times PI \times PD \quad (5)$$

5. Risco de doença na população

O risco da doença na população foi obtido através do perfil de consumo de lingüiça frescal e o risco de obtenção de unidades contaminadas conforme o número ingerido. Esse risco foi calculado através da distribuição binomial

$$P(x \geq i), 1 \leq i \leq 6 = \text{Binomial}(x; n; p; 0), \quad (6)$$

onde x é o número de unidades contaminadas, n unidades ingeridas e p é o RD.

5.1. Número de casos:

5.1.1. Cenário 1

O número de casos foi obtido através da distribuição binomial ($n; p$), onde n é o número de refeições e p é a probabilidade de adoecer na população, ou seja, o risco de doença (RD). Foi utilizado no modelo 10.000 refeições.

5.1.2. Cenário 2:

Para um cenário mais realista, utilizou-se como parâmetro de perfil de consumo a ingestão de lingüiça frescal em churrasco, por ser esta uma forma de consumo do produto comum na região. O número de churrasco mensal, extrapolado dos resultados das entrevistas, foi estimado para a população de Porto Alegre [N = 1,4 milhão, segundo IBGE (2007)]. O risco foi calculado considerando o tempo de aquecimento de 15 minutos.

6. Simulação:

Simulações de Monte Carlo com 10.000 iterações foram realizadas utilizando-se o programa @Risk (Palisade Corporation).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No caso de infecção alimentar causada por *Salmonella*, a probabilidade de introdução corresponde à frequência e intensidade da contaminação nos produtos de origem animal, enquanto a probabilidade de exposição à frequência e importância do consumo do produto (TOMA et al., 1999).

Utilizou-se o resultado obtido em 336 amostras de lingüiça frescal suína analisadas das quais 82 (24,4%) amostras havia *Salmonella* com quantidades que variaram de 0,03 a 460 NMP/g (MÜRMAN; SANTOS; CARDOSO, 2005). Estudos indicam que a dose infectante de *Salmonella* é altamente variável. Embora 10^5 - 10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) seja considerada uma dose infectante típica para humanos, diversos surtos de salmonelose foram relatados com doses muito menores (VARNAM, 1991).

Os dados obtidos através do questionário aplicado identificaram que a maioria dos entrevistados (87,5%) costuma ingerir lingüiça frescal, independente da faixa etária. O consumo de lingüiça frescal por refeição variou de uma a seis unidades, sendo que 36% dos entrevistados (153/424) declararam que costumam ingerir uma unidade por refeição. Uma das formas mais comuns de ingestão de lingüiça frescal na cidade de Porto Alegre é no churrasco, onde 29% da população entrevistada declarou que costuma consumir churrasco quatro vezes por mês.

Uma pequena porcentagem da população avaliada (3%) admitiu o hábito de ingerir o produto sem qualquer tratamento térmico, mas a maioria realiza o cozimento, o

qual controla os níveis de contaminação, pois o uso de altas temperaturas para conservar alimentos está baseado em seu efeito destrutivo sobre os microrganismos (JAY, 2005).

Neste trabalho, o resultado das curvas de destruição da *Salmonella* na unidade do produto, indicou que a redução mais significativa ocorre entre os 10 e 15 minutos de aquecimento (Figura 2). Isto ocorre porque o centro geométrico do produto demora mais tempo para atingir uma temperatura capaz de destruir os microrganismos presentes (JAY, 2005), sendo que, quanto maior o tempo de aquecimento, maior o efeito de morte pelo calor.

O risco estimado de se obter uma salmonelose através da ingestão de lingüiça frescal encontra-se descritos na tabela 3. Considerando-se a diferença de intervalos de tempo de aquecimento, observa-se um risco extremamente baixo. Acredita-se que este produto seja aquecido por um tempo mínimo de 15 minutos, logo o risco da população contrair salmonelose é mínimo ($6,12 \times 10^{-7}$). O mesmo cenário foi alcançado em trabalho semelhante realizado por Bemrah (2003), em “cordon bleu” após o cozimento em forno onde, em qualquer distribuição inicial de *Salmonella*, o risco de salmonelose calculado foi igual a zero.

A cada 10.000 refeições em cada diferente intervalo de tempo de aquecimento obteve-se, para o cozimento de 5, 10 e 15 minutos, uma média de 400,07; 258,64 e 0,01 casos de doença, respectivamente (Tabela 4). Observa-se significativa semelhança entre os efeitos de cozimento nos tempos de 5 e 10 minutos e grande diferença entre estes e o efeito de cozimento por 15 minutos, tempo ao final do qual praticamente anula-se a possibilidade doença causada por *Salmonella* devido à ingestão de lingüiça frescal suína. Com esse período de aquecimento, o número máximo de dois casos só surgiu após terem ocorrido 99,99% das iterações. Estes resultados atestam a eficiência que a prática comum de assar o produto por, pelo menos, 15 minutos tem em tornar o produto seguro.

Também foram estimados a probabilidade do surgimento de casos de salmonelose e o número de casos entre a população que ingere o produto sem qualquer tratamento térmico. A situação mais provável é que haja a ingestão de um número menor de unidades crua em relação às até seis inicialmente consideradas durante o consumo de churrasco, uma vez que a probabilidade de ingerir um grande número de lingüiça frescal crua é remota. O risco de ingerir uma única unidade contaminada do produto cru é mostrado juntamente com os dados da tabela 4, a qual indica que o número médio de

casos de salmonelose, considerando a ingestão de uma única unidade é de 8,78 a cada 10.000 refeições.

Um segundo cenário foi proposto devido ao costume na região sul do Brasil da ingestão da lingüiça frescal suína, como entrada para refeição conhecida por churrasco, que consiste em carne assada em espetos na churrasqueira. Esta técnica também é usada para preparar a própria lingüiça que é normalmente assada por tempo maior que 15 minutos. Os resultados desta simulação foram baseados na estimativa de churrasco consumidos por mês (conforme questionário), população total de Porto Alegre (IBGE, 2007) e risco de doença no tempo de cozimento de 15 minutos. Dentre os 3.354.716 churrascos estimados consumidos mensalmente em Porto Alegre, o resultado do modelo foi no mínimo de 0,01, médio de 2,05 e máximo de 11,08 casos de doenças por mês. A distribuição de probabilidade do número de casos de doença por mês encontra-se na figura 3.

Outros trabalhos relacionados à análise de risco em produtos suínos também foram desenvolvidos por outros grupos de pesquisa. Giovannini et al. (2004), que realizaram uma avaliação de risco da ingestão de lingüiça fresca crua de suínos na região de Abruzzi na Itália, concluíram que estas podem ser uma das causas de salmonelose em humanos naquela região. Por outro lado, Alban et al. (2002) realizaram uma avaliação de risco da ingestão de lingüiças secas curadas de suínos na Dinamarca, observando que houve uma baixa prevalência de DT104 nas lingüiças, sendo que estas não constituíam um risco a saúde do consumidor.

Dessa forma, observa-se que o risco que um determinado alimento oferece à população está relacionado não apenas a presença e a quantidade do patógeno estudado, mas é influenciado também pela forma de preparo e de consumo do alimento, o que está relacionado ao costume de uma determinada população. Por esta razão, a análise de risco conduzida no presente estudo indica que assar a lingüiça frescal, conforme o método tradicional da região, torna remota a possibilidade de ocorrência de salmonelose a partir da ingestão desse alimento, elucidando o baixo envolvimento deste produto em surtos alimentares notificados.

CONCLUSÃO

O risco de ocorrer salmonelose após a ingestão de lingüiça frescal suína submetida à tratamento térmico (200 °C) por no mínimo 15 minutos é muito baixo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAN, L. et al. Qualitative and quantitative risk assessment for human salmonellosis due to multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT 104 from consumption of Danish dry-cures pork sausages. **Preventive Veterinary Medicine**, v.52, p.251-265, 2002.

BARBETTA, P.A. **Estatística Aplicada às Ciências Sociais**. 6.ed. UFSC: Florianópolis, 2006. 315p.

BEMRAH N. et al. Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of turkey product in collective catering establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.17-30, 2003.

BOROWSKY, L.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Estimation of Most Probable Number of *Salmonella* in minced pork samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.3, p.544-546, 2007.

CANTONI, C.; D'AUBERT, S.; TRALDI, C. Sierotipi di *Salmonella* nell'uomo e negli alimenti nel triennio 1988-1991 in Itália. **Archivio Veterinario Italiano**, v.44, n.3, p.1-14, 1993.

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

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. **Braz. J. Microbiol.**, v.33, p.342-346, 2002.

FEPPS/IPB/LACEN. Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde/ Instituto de Pesquisa Brasileira/Laboratório Central do Rio Grande do Sul. **Relatório de Investigações de surtos de Salmonelose de 1984 a 1999**. Porto Alegre. 1999.

FORSYTHE, S.J. **Microbiological Risk Assessment of Food**. USA: Blacwell publishing, 2002. 212p.

GIOVANNINNI, A. et al. Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. **Food Control**, v.15, p.139-144, 2004.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>. Acesso em: 27 dez. 2007.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de alimentos. In: ROIMAN, L.R. TRAVASSOS, J.L., AZEVEDO. **Tratado de Microbiologia**, São Paulo: Manole, 1988. p.30-75.

McCULLOUGH, N.B.; EISELE, C.W. Experimental human salmonellosis: I. Pathogenicity of strains of *Salmonella* meleagridis and *Salmonella* anatum obtained from spray-dried whole egg. **Journal of Infectious Diseases**, v.88, p.278–289, 1951.

MEAD, P.S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Disease**, v.5, p.607-625, 1999.

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, 2003.

MÜRMAN L.; SANTOS M.C.; CARDOSO M. Prevalence and level of *Salmonella enterica* in pork fresh sausages purchased in Southern Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM *SALMONELLA* AND SALMONELLOSIS, 2005, Saint-Malo. **Proceedings**. Saint-Malo: ISPAIA, 2005. p.443-444.

MURRAY, N. et al. **Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products. Quantitative Risk Assessment**. France: OIE, v.2, 2006, 126p.

PAS, PROGRAMA ALIMENTO SEGURO. **Análise de Riscos na Gestão da Segurança de Alimentos**. 2004. 44p.

ROSE, J.B.; HAAS, C.N.; REGLI, S. Risk Assessment and Control of Waterborne Giardiasis. **Am. J. Public Health**, v.81, n.6, p.709–713, 1991.

ROSE, J.B.; GERBA, C.P. Use of risk assessment for development of microbial standards. **Water Science and Technology**, v.24, p.29–34, 1991.

SAUER, C.J. et al. Food-borne illness outbreak associated with a semi dry fermented sausage product. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.60, n.12, p.1612-1617, 1997.

SCUDERI G.; SQUARCIONE S.; GRECO D. Tossinfezioni alimentari da *Salmonella* in Italia: il sistema di notifica dei focolai epidemici. **Rapporti ISTISAN**, v.93, n.30, p.17-38, 1993.

TOMA, B. et al. **Applied Veterinary Epidemiology and Control of Disease in Populations**. France: AEEMA, 1999. 536p.

VARNAM, A.S. *Salmonella*. In: **Foodborne Pathogens**. London: Wolfe Publishing, 1991. cap.4, 462 p.

WEGENER, H.C.; BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p.3-8.

Tabela 1 - Distribuição das variáveis.

Variável	Definição	Unidade	Distribuição/modelo
<i>Fr</i>	Frequência de contaminação	-	Beta (83; 255)
<i>Qmp</i>	Determinação do valor mais provável	NMP/g	Cumulativa (0,03;460; <i>x</i> _{<i>i</i>} ; <i>p</i> _{<i>i</i>})
<i>Qu</i>	Quantidade por unidade	NMP/g	Poisson (<i>Qmp</i> ; 1)
<i>D</i>	Tempo de redução decimal	minutos	$t/(\log A - \log B)$
<i>Ec</i>	Eficiência de Cozimento	-	$Ec = (t_f - t_i)/D$
<i>Cr</i>	Concentração Resultante	NMP	$Cr(t_i) = Cr_{i,5}/10^{Ec_i}$, $i = 5, 10, 15$

Tabela 2- Descrição e distribuição das variáveis e modelos da avaliação de risco de salmonelose devido ao consumo de lingüiça frescal suína.

Variável	Definição	Distribuição/modelo
PI	Probabilidade de infecção	$1 - (1 + Cr/139,9)^{-0,33}$
PD	Probabilidade de doença	Pert (0; 0,16; 0,75)
RI	Risco individual	$Fr \times PI \times PD$
RD	Risco de doença na população	$\sum [\text{Consumo} \times \sum \text{Binomial}(x; n; RI)]$.
N1	N casos cenário 1	Binomial (10000; RD)
N2	N casos cenário 2	N refeições/mês x RD

Tabela 3: Resultado do modelo ilustrando a estimativa de riscos de doença na população conforme intervalos de tempo de aquecimento. Simulação computacional com 10.000 iterações.

Cenário	Mínimo	Média	Máximo	IC (95%)	
Cru*	4,88E-06	8,79E-04	3,26E-03	1,20E-04	2,05E-03
T5	1,25E-04	4,00E-02	1,35E-01	5,34E-03	9,13E-02
T10	1,44E-04	2,59E-02	1,01E-01	3,49E-03	6,15E-02
T15	2,34E-09	6,12E-07	3,30E-06	7,20E-08	1,60E-06

* Simulação levando a consideração apenas a população que ingere cru e a ingestão de uma única unidade do produto.

Tabela 4: Resultado do modelo ilustrando o número de casos de doença conforme intervalos de tempo de aquecimento. Simulação computacional com 10.000 iterações.

Cenário	Mínimo	Média	Máximo	Moda
N casos cru*	0	8,78	37	5
N casos (T5)	0	400,07	1347	294
N casos (T10)	0	258,64	996	153
N de casos (T15)	0	0,01	2	0

* Simulação levando a consideração apenas a população que ingere cru e a ingestão de uma única unidade do produto.

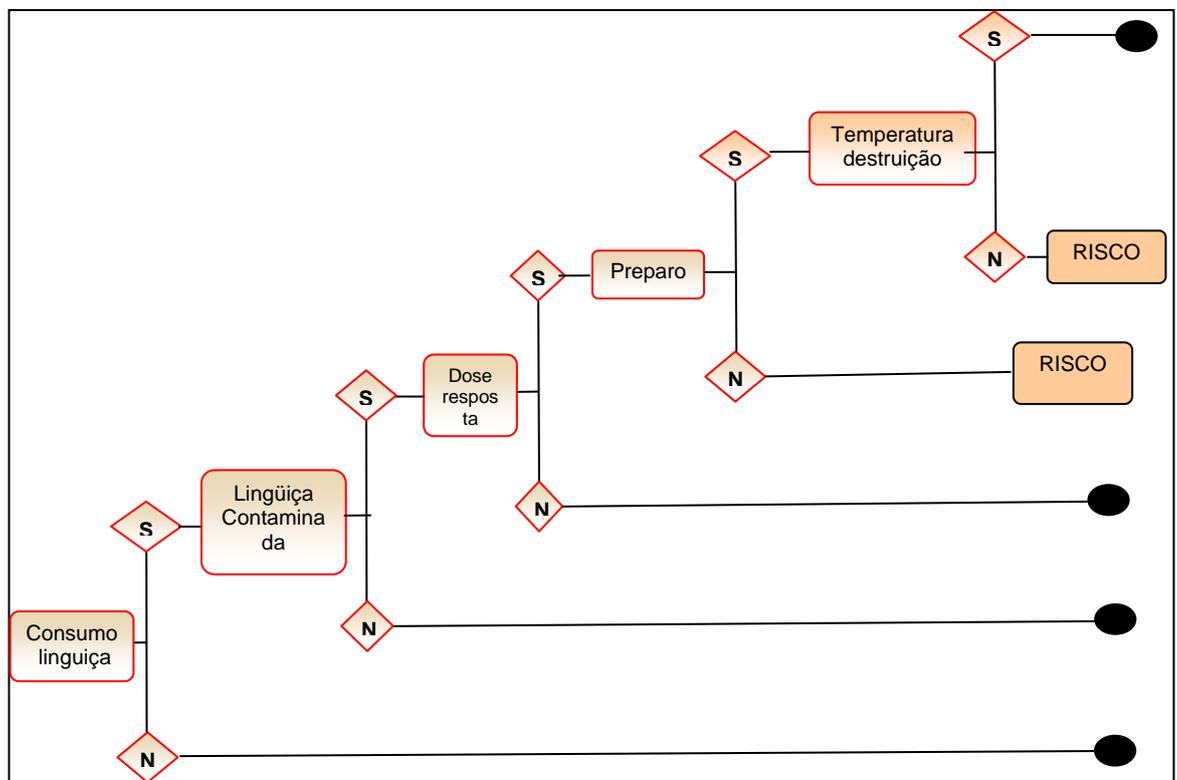


Figura 1 - Algoritmo representativo do processo de introdução e exposição à *Salmonella* na população estudada.

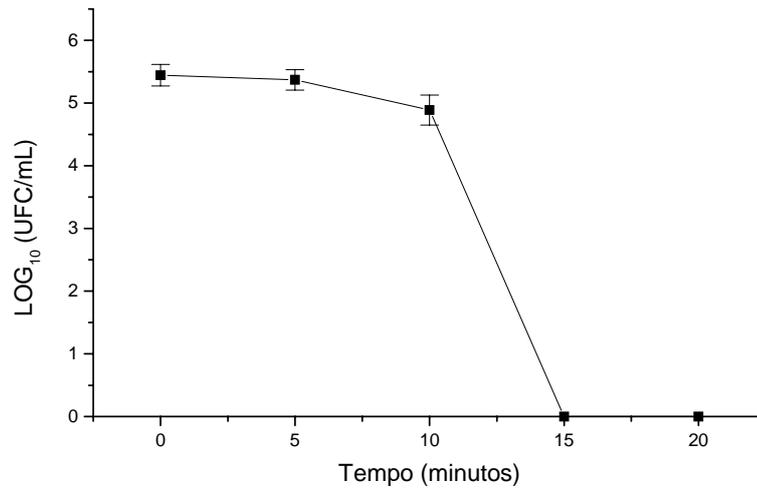


Figura 2- Curva de destruição do isolado do sorovar Typhimurium inoculado em lingüiça frescal suína.

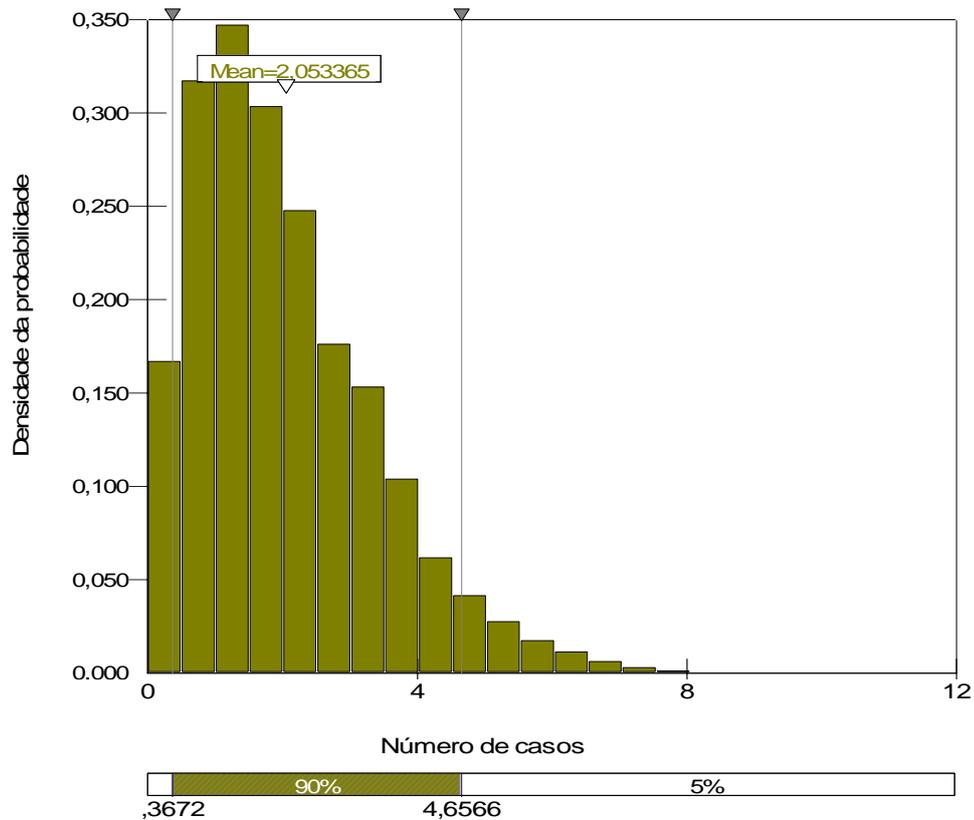


Figura 3- Distribuição de probabilidade de casos por mês de salmonelose na cidade de Porto Alegre devido a ingestão de lingüiça frescal suína conforme o número de churrascos, com tempo de aquecimento de 15 minutos.

CAPÍTULO 6- Discussão Geral

Discussão Geral

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

Salmonella sp. é um dos principais microrganismos envolvidos em toxinfecções alimentares em diversos países e já há vários anos é responsável pela maioria dos surtos investigados no Rio Grande do Sul (LACONHA et al., 2000; LOPALCO et al., 2000; RIO GRANDE DO SUL, 2001). Nos relatos disponíveis, observa-se a predominância de alimentos contendo ovos entre os veiculadores dessa bactéria, ao passo que a carne suína e seus derivados têm apresentado uma baixa participação nos surtos investigados nesse Estado. No entanto, isso não significa uma baixa prevalência de *Salmonella* sp. em suínos criados nessa região. Ao contrário, estudo realizado no Rio Grande do Sul (BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004) constataram um número expressivo de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate, representando uma fonte potencial de contaminação para os produtos de origem suína. Essa relação foi demonstrada por Castagna et al. (2004b) que, avaliando produtos elaborados a partir de matéria-prima proveniente de lotes suínos com elevada prevalência de animais portadores ao abate, encontraram uma frequência média de 94% de amostras de massa de embutidos com presença de *Salmonella* sp.

A discrepância entre os resultados de isolamento a partir de amostras provenientes da cadeia de produção de suínos e participação de alimentos derivados dessa espécie nos surtos investigados no Rio Grande do Sul motivou a proposta do presente estudo: conduzir análise de risco do consumo de lingüiça de carne suína, produto que não sofre tratamento térmico durante sua elaboração na indústria e que é altamente consumido na região.

A partir disso, iniciou-se a coleta dos dados necessários para a condução da análise de risco, primeiramente pela avaliação da prevalência e do nível de

contaminação de lingüiça frescal de carne suína comercializada no Rio Grande do Sul. Houve a presença de *Salmonella* em 24,4% das amostras analisadas, indicando que a carne suína pode ser efetivamente um potencial veiculador de *Salmonella* sp. até a mesa do consumidor. Esse dado está de acordo com outros estudos conduzidos, como os de Mrema, Mpuchane e Gashe (2006), em Botswana, que encontraram 26% de salsichas contaminadas com *Salmonella*. Já Escartín et al. (1999), no México, encontraram 88,3% dos embutidos suínos amostrados em açougues positivos para *Salmonella*. Outros autores encontraram níveis menores de contaminação, entre 1,7 e 17,6%, demonstrando que as frequências reportadas podem ser altamente variáveis, de acordo com o produto analisado e a origem das amostras (BOUGHTON et al., 2004; RANUCCI et al., 2004; GIOVANNINI et al., 2004). No presente estudo, optou-se por avaliar um produto inspecionado e oferecido no comércio regular de Porto Alegre, no intuito de estimar o possível risco existente para um consumidor consciente, que busca produtos de qualidade e seguros. Por essa razão, a frequência de isolamento encontrada é considerada elevada representando, de acordo com a legislação, produtos inadequados ao consumo.

Para obter resultados precisos em uma análise de risco os dados de prevalência devem ser complementados com a determinação da quantidade do microrganismo presente no alimento. Dessa forma, paralelamente à pesquisa da presença de *Salmonella* sp. no produto analisado, foi avaliada a quantidade presente pela técnica do Número Mais Provável (NMP). Observou-se a presença de uma quantidade baixa de *Salmonella*, onde os níveis encontrados variaram entre 0,03 e 460 NMP.g⁻¹, com mediana de 0,23 NMP.g⁻¹. Estes níveis estão distantes da dose considerada infectante, a qual, segundo Varnam (1991) pode variar de 10⁵ – 10⁷ UFC. Verificou-se que entre as amostras analisadas havia uma percentagem elevada de produtos que não atendiam à legislação, ou seja, que apresentavam presença de *Salmonella* sp. detectável pelos métodos de isolamento, porém numa quantidade que não corresponde àquela usualmente associada ao desencadeamento de doença. Entretanto, fatores relacionados com o armazenamento e processamento podem influenciar diretamente nas contagens presentes no alimento no momento do consumo, alterando o risco que o mesmo representa para o consumidor. Essa dinâmica de multiplicação e destruição, portanto, não pode ser desprezada ao avaliar o risco de um alimento.

Tendo conhecimento de que a microbiologia preditiva é uma ferramenta básica para estimar o comportamento microbiano em alimentos durante armazenamento e processamento (BOVIL; BEW; BARANYI, 2001), dados referentes à cinética de crescimento e destruição da *Salmonella* em diferentes tempos e temperaturas têm sido considerados essenciais para simular diferentes cenários em uma análise de risco.

A partir disso, estudou-se o comportamento de isolados de *Salmonella* sp. provenientes de lingüiça frescal suína, cultivados em caldo nutriente, em diferentes temperaturas. Os resultados evidenciaram que, após duas horas em temperatura ambiente a multiplicação do microrganismo tem início, e em algumas horas poderá alcançar a dose infectante. Devido a esta multiplicação, é importante que os alimentos perecíveis não sejam armazenados por muito tempo fora da refrigeração, devendo, segundo a RDC 216 (BRASIL, 2004), ser expostos à temperatura ambiente somente pelo tempo mínimo necessário, a fim de não comprometer a qualidade higiênico-sanitária do alimento.

Na temperatura de refrigeração a população de *Salmonella* manteve-se constante pelos 30 dias de observação, indicando que, caso um alimento tenha níveis altos de contaminação antes do armazenamento, estas quantidades serão mantidas, não sendo, portanto, a refrigeração uma ferramenta para “melhorar” a qualidade de um alimento que sofreu abuso de temperatura ou má manipulação.

Levando-se em consideração que o produto pesquisado (lingüiça frescal suína) é supostamente consumido após tratamento térmico, também foram realizadas simulações de destruição térmica do microrganismo em caldo nutriente. Pelos resultados obtidos observou-se que, após 20 minutos, a uma temperatura de 60°C, a bactéria foi totalmente destruída. As quantidades inoculadas nesse ensaio foram elevadas, simulando um provável abuso na temperatura de conservação do alimento antes de sua preparação. Assim, em cenários onde o alimento tenha uma quantidade inferior de bactérias, o tempo de destruição será menor.

Considerando que a matriz do alimento tem influência sobre o padrão de multiplicação e morte das populações microbianas presentes, as simulações de armazenamento e cozimento foram repetidas em lingüiça frescal de carne suína inoculada com quantidades estabelecidas de *Salmonella* Typhimurium. Os resultados dessas simulações indicaram uma variação muito baixa da quantidade de *Salmonella* quando o alimento foi submetido a diferentes temperaturas de armazenamento por diferentes tempos, tanto em temperatura ambiente como sob refrigeração (Apêndice 2).

Nesse caso, observou-se que a matriz do alimento dificultou a multiplicação da bactéria na temperatura ambiente, o que não havia ocorrido com a simulação em caldo nutriente. Já em temperatura de cozimento em forno elétrico (200°C), no tempo de 15 minutos, a população total de *Salmonella* presente no alimento foi destruída. Desta forma, é preciso enfatizar a importância de temperatura e tempo adequados para a inativação do microrganismo, pois, segundo Germano & Germano (2001) a contaminação de um alimento, pode persistir caso a temperatura ou tempo de cocção não sejam suficientes para sua destruição. A partir dessa etapa do estudo, comprovou-se que as atitudes adotadas pelo consumidor em relação ao produto podem influenciar diretamente o risco que este oferece. Ou seja, mesmo numa situação altamente indesejável, onde exista a presença de *Salmonella* sp. no produto, caso essa população bacteriana seja mantida em baixo nível (pela refrigeração) e posteriormente eliminada por temperatura de destruição pelo tempo necessário no centro geométrico do alimento, poderá não ocorrer a doença.

Como etapa paralela do estudo buscou-se avaliar o perfil dos casos onde ocorreu doença como desfecho do consumo de alimentos. Para isto, dados referentes aos surtos de salmonelose que ocorreram na mesma época das análises realizadas em amostras de lingüiça frescal de carne suína obtidas no mercado foram coletados, e conduziu-se a quantificação e identificação de cepas de *Salmonella* sp. presentes em alimentos envolvidos nos referidos surtos. Nessa etapa, confirmou-se a predominância de alimentos a base de ovos entre os implicados nos surtos, bem como a elevada contagem de *Salmonella* sp. presente, indicando prováveis deficiências de armazenamento e preparo dos mesmos.

Segundo Heriskstad, Motarjemi e Tauxe (2002), *Salmonella enterica*, subsp. *enterica* dos sorovares Enteritidis e Typhimurium são os principais causadores de infecção em humanos e animais em todo o mundo. Esta afirmação está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, onde todos os surtos analisados foram causados por *S. Enteritidis*, indicando a predominância desse sorovar nos surtos ocorridos no Estado. Estes isolados, quando submetidos à análise de macro-restrição, apresentaram um perfil único, podendo significar a predominância de linhagens clonais envolvidas em surtos na região. Ao contrário, entre os isolados provenientes de lingüiça frescal de carne suína, doze diferentes sorovares com diferentes perfis de macro-restrição, haviam sido identificados, sendo que *S. Enteritidis*, não foi encontrada. Este resultado confirma os dados já previamente reportados na região (BESSA et al., 2004;

CASTAGNA et al., 2004) e, mais uma vez, demonstra a baixa participação de produtos de origem suína em surtos investigados.

Para permitir a montagem dos cenários de risco era, ainda, necessário determinar a quantidade usualmente ingerida do alimento, bem como sua forma de preparo do mesmo pela população. Para isso, conduziram-se entrevistas num local de grande frequência da população de Porto Alegre. As informações obtidas indicaram que a maioria dos entrevistados (87,5%) costuma ingerir lingüiça frescal, independente da faixa etária. O consumo de lingüiça frescal por refeição (churrasco) variou de 0 a 6 unidades, sendo que 36% dos entrevistados (153/424) costuma ingerir uma unidade por refeição. Uma pequena porcentagem da população avaliada (3%) admitiu o hábito de ingerir o produto sem qualquer tratamento térmico. Dessa forma, confirmou-se que o alimento estudado é amplamente consumido pela população após tratamento térmico, indicando que a destruição de *Salmonella* sp. pela forma usual de preparo é altamente provável.

Como última etapa, a tendência indicada pelos resultados obtidos até aqui pode ser quantificada pela análise de risco. Nessa fase, partindo dos dados colhidos, foram possíveis a construção do algoritmo e a simulação do risco de adquirir salmonelose através da ingestão de lingüiça frescal suína. Levando-se em consideração o costume da população estudada de ingerir este produto após tratamento térmico, o risco encontrado foi muito baixo ($6,12 \times 10^{-7}$). Esse resultado contribui para explicar o baixo envolvimento do produto pesquisado em toxinfecções alimentares.

Para uma pequena parte da população que costuma ingerir o produto sem qualquer tratamento térmico, em uma simulação realizada com 10.000 refeições, poderá haver 8,78 casos da doença, considerando a ingestão de uma única unidade. Esse cenário demonstra claramente a influência da forma de preparo e consumo de um alimento no risco que o mesmo oferece.

Finalmente, dentro de um perfil típico de preparação e consumo de lingüiça frescal de carne suína pela população de Porto Alegre, ou seja, como acompanhamento de churrasco, após tratamento térmico por 15 minutos, calculou-se a probabilidade de ocorrência de doença. Dentre os estimados 3.354.716,98 churrascos consumidos mensalmente em Porto Alegre, o resultado do modelo indicou um mínimo de 0,01, média de 2,05 e máximo de 11,08 casos de doenças por mês. Nesse cenário é possível que o baixo número de casos que estejam ocorrendo passem despercebidos pelas

autoridades sanitárias, uma vez que talvez ocorram sob forma de casos isolados que não sejam notificados, investigados e incluídos nos relatórios divulgados.

A qualidade do alimento ingerido deve ser uma preocupação constante dos consumidores e das autoridades sanitárias. Assim, a busca por produtos livres de agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos é importante tanto para a saúde do consumidor como para a disputa de mercados, não devendo ser abandonada. Nesse contexto, a análise de risco participa demonstrando a probabilidade de ocorrência de doença a partir das condições de produção e consumo de um dado alimento, podendo ser uma ferramenta para estabelecer prioridades, bem como forma de simular o efeito que qualquer variação no cenário encontrado (prevalência de positivos, quantidade, consumo, etapas de controle) pode exercer sobre a ocorrência de doença transmitida por alimentos na população.

CONCLUSÕES

A análise de risco demonstrou que a ingestão de lingüiça frescal suína comercializada em Porto Alegre consumida na forma de preparo mais utilizada pela população apresenta probabilidade de causar poucos casos isolados de salmonelose, justificando a baixa frequência de envolvimento deste produto em surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados na região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRON, P.G. et al. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.4984-4991, 2001.

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.

AMI. American Meat Institute. Microbiological Testing. Disponível em:

<<http://www.meatami.com/Content/PressCenter/factsheets/microbiologicaltesting.pdf>>.

Acesso em: 08 ago. 2007.

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

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

BAGGESEN, D. L. et al. Critical control points (CPC) in pig herds in relation to subclinical *Salmonella* infection. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY, 14., 1996, Bologna. **Proceedings**. Bologna: [sn], 1996. p.171.

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. 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 suínos abatidos em frigoríficos do RS. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.2, p.80-84, 2004.

BOUGHTON, C. et al. Prevalence and Number of *Salmonella* in Irish Retail Pork Sausages. **Journal of Food Protection**, v.67, n.9, p.1834-1839, 2004.

BOUVET, P.J.M. et al. Human salmonellosis surveillance in France: recent data from the national Reference Center. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM *SALMONELLA* & SALMONELLOSIS, 2002, St. Brieuc. **Proceedings**. St. Brieuc: [sn], 2002. p.411-416.

BOVIL, R.A., BEW, J., BARANYI, J. Measurements and predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. Rapidly changing temperatures. **International Journal Food Microbiology**, v.67, p.131–137, 2001.

BRASIL. 2004. Resolução-RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**, DF, 16 set.

BRYAN F.L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. **Journal Food Protection**, v.43, p.140-50, 1980.

CANTONI, C.; D'AUBERT, S.; TRALDI, C. Sierotipi di *Salmonella* nell'uomo e negli alimenti nel triennio 1988-1991 in Itália. **Archivio Veterinario Italiano**, v.44, n.3, p.1-14, 1993.

CARREIRA, G.S. et al. Avaliação das temperaturas de manipulação, armazenamento e comercialização de carne em 2 supermercados de Belém-PA. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 13., 2003, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: ENAAL, 2003. p.156.

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, 2004a.

CASTAGNA, S.M.F. et al. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.2, p.141-147, 2004b.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Salmonellosis- General Information. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Disponível em:

<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm>. Acesso em: 08 ago. 2007.

CHAVES, G.M.C. et al. Avaliação bacteriológica de lingüiça frescal suína comercializada no Município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, 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.

DAVIES, R.H., et al. National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999–2000). **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.750–760, 2004.

DESIRE, S.; TONDO, E.C. Análise de perigos e pontos críticos de controle em uma unidade de alimentação e nutrição. **Higiene Alimentar**, v.15, n.85, p.41-49, 2001.

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.

EUROPEAN COMMISSION. Opinion of the Scientific Committee on veterinary measures relating to public health on food-borne zoonoses. 2000. Disponível em: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out32_en.pdf. Acesso em: 26 abr. 2006.

FLYNN, O.M.J.; BLAIR, I.; MCDOWELL, D. The efficiency and consumer operation of domestic refrigerators. **International Journal of Refrigeration**, v.15, n.5, p.307-312, 1992.

FORSYTHE, S.J. **Microbiological risk assessment of food**. USA: Blacwell publishing, 2002. p.212.

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

FUZHARA, T.O.; FERNANDES, S.A.; FRANCO, B.D. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal Food Protection**, v.63, p.1749-1753, 2000.

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, 2004.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

GIOVANNINI, A. et al. Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. **Food Control**, v.15, p.139-144, 2004.

GORTON, S.J.; KLIEBENSTEIN, J.B.; BERAN, G.W. Cost of on-farm microbial testing for *Salmonella*: An application by farm size and prevalence level. **ISU Swine Research Report**, 1996. Disponível em: <<http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports/asl-1413.pdf>>. Acesso em: 05 maio. 2004.

GOTTARDI, C.P.T. **Surtos de toxinfecção alimentar notificados e investigados no município de Porto Alegre no período de 1995 a 2002**. 2003. 46f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

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

HALD, T. et al. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. **Epidemiology and Infection**, v.131, p.1187-1203, 2003.

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

HAZELWOOD, D.; McLEAN, A.C. **Manual de higiene para manipuladores de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 140 p.

HERIKSTAD, H.; MOTARJEMI Y.; TAUXE, R.V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiology and Infection**, v.129, p.1-8, 2002.

HILUY, D.J. Avaliação das condições de armazenagem de produtos perecíveis comercializados na cidade de Fortaleza-CE. **Higiene Alimentar**, v.11, n.48, p.30-32, 1997.

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.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. 4.ed. São Paulo: Varela, 1999. 376p.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkims, 1994. 787p.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I.A.; O'BRIEN, SJ. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. **Food Control**, v.18, p.766-772, 2007.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specification For Foods. In: ROBERTS, T.A. **Microorganisms in foods**. London: Blackie academic and professional, 1998. 615 p.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Relatório da medição de temperatura em freezers de supermercados**. Rio de Janeiro. 1996.

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.

JOHNSON, A.E. et al. Food safety knowledge and practice among elderly people living at home. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v.52, n.11, p.745-748, 1998.

JUNEJA, V.K. et al. Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. **Food Microbiology**, v.24, p.328–335, 2007.

LACONHA, I. et al. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.155-165, 2000.

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.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de alimentos. In: ROIMAN, L.R. TRAVASSOS, J.L., AZEVEDO. **Tratado de Microbiologia**, São Paulo: Manole, 1988. p.30-75.

LIEBANA, E.L. et al. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 4, 7, 6, 8, 13a, 29 e 34: a comparative analysis of genomic fingerprints from geographically distant isolates. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM *SALMONELLA* & SALMONELLOSIS, 2002, St. Brieuc. **Proceedings**. St. Brieuc: [sn], 2002. p.87-88.

LIN, A.W. et al. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* Enteritidis epidemic. **Journal Clinical Microbiology**, v.34, p.870-876, 1996.

LOPALCO, P.L. et al. Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella* Enteritidis epidemic. **Ann.Ig.**, v.12, p.279-285, 2000.

LÍRIO, V.S. et al. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v.12, n.55, p.36-42, 1999.

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. Sorotipos de *Salmonella* isolados em uma propriedade de suínos de terminação no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v.32, n.3, p.525-527, 2002.

McDOWELL, S.W.J. et al. *Salmonella* in slaughter pigs in Northern Ireland: Prevalence and use of statistical modelling to investigate sample and abattoir effects. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, n.2, p.116-125, 2007.

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

MORROW, W.E.M. et al. Prevalence of *Salmonella* spp. in the feces on farm and ceca at slaughter from a cohort of finishing pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [sn], 1999. p.155-157.

MREMA, N.; MPUCHANE, S.; GASHE, B. Prevalence of *Salmonella* in raw minced meat, raw fresh sausages and raw burger patties from retail outlets in Gaborone, Botswana. **Food Control**, v.17, p.207-212, 2006.

MÜRMAN, L.; MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. Temperaturas de armazenamento de alimentos em estabelecimentos comerciais na cidade de Santa Maria, RS. **Acta**

Scientiae Veterinary, v.3, p.309-313, 2005.

MURRAY, N. et al. **Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products. Quantitative Risk Assessment**. France: OIE, v.2, 2006. 126p.

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

PAS, PROGRAMA ALIMENTO SEGURO. **Análise de riscos na gestão da segurança de alimentos**. 2004. 44 p.

PERESI, J.T.M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v.32, n.5, p.477-483, 1998.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2001 (n°45) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v.154, n.3, p.173-174, 2003.

RANUCCI, D. et al. Microbiological characteristics of hamburgers and raw pork sausages, and antibiotic-resistance of isolated bacteria. **Veterinary Research Communications**. v.28, p.269–272, 2004.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. Divisão de Vigilância Sanitária. **Relatório anuais de DTA**. Porto Alegre, 2001. (não paginada).

ROSTAGNO, M.H. et al. *Salmonella* infection in market swine during pre-slaughter holding. In: IPVS CONGRESS, 17., 2002, Iowa. **Proceedings**. Iowa: [sn], 2002. v.1, p.149.

RYAN, M. J. et al. Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. **Communicable Disease Report CDR Review**, v.6, n.13, p.179–182, 1996.

SANTOS, D.M.S.A. et al. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, p.39-42, 2000.

SÃO PAULO. Decreto nº 12342 de 27 de setembro de 1978. **Código Sanitário de São Paulo, Imprensa Oficial**. São Paulo, 1978. p.376.

SAUER, C.J. et al. Food-borne illness outbreak associated with a semi dry fermented sausage product. **Journal of Aquatic Food Product Technology**., v.60, n.12, p.1612-1617, 1997.

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

SCUDERI G.; SQUARCIONE S.; GRECO D. Tossinfezioni alimentari da *Salmonella* in Italia: il sistema di notifica dei focolai epidemici. **Rapporti ISTISAN**, v.93, n.30, p.17-38, 1993.

SERRA, J.A. et al. Risk assessment and critical control points from the production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, p.9-26, 1999.

SHELOBOLINA, E.S. et al. Isolation, characterization and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.2959-2965, 2004.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e Patologia Suína**. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 1999. 402p.

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: [sn], 1999. p.264-265.

SWANENBURG, M. et al. Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.114, p.356-359, 2001a.

SWANENBURG, M. et al. A. *Salmonella* in the lairage of pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v.64, n.1, p.12-16, 2001b.

TAVECHIO, A.T. et al. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.5, p.315-322, 1996.

TAVECHIO, A.T., et al. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v.65, p.1041-1044, 2002.

THOMSON, J.E.; WHITEHEAD, W.K.; MERCURI, A.J. Chilling poultry meat-a literature review. **Poultry Science**, v.53, n.4, p.1268-1281, 1974.

TOMA, B. et al. **Applied Veterinary Epidemiology and control of disease in populations**. France: AEEMA, 1999. 530 p.

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

VAN DER GAAG, M.A. et al. A state-transition simulation model for the spread of *Salmonella* in the pork supply chain. **European Journal of Operational Research**, v.156, n.3, p. 782-798, 2004.

VARNAM, A.S. *Salmonella*. In: **Foodborne Pathogens**. London: Wolfe Publishing, 1991. cap.4, 462 p.

WEGENER, H.C.; BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosis. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF**

SALMONELLA IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p.3-8.

WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis. In: LEMAN, A.D. et al. **Diseases of Swine**. 7.ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. p.570-583.

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

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.

APÊNDICES**Apêndice 1**

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Aplicado por:

1- Sexo-

 Feminino Masculino

2- Qual a sua faixa etária?

 <20 21-30 31-40 41-50 51-60 >60

3- Qual seu grau de instrução?

 1º grau incompleto 1º grau completo 2º grau incompleto 2º grau completo Graduação incompleta Graduação completa Pós-graduação

4- Quantas pessoas moram em sua residência?

 1 2 3 4 5 mais de 5

5- Quantas vezes você costuma comer churrasco por mês?

 1 2 3 4 mais de 4 não sei

6- Você costuma incluir salsichão no churrasco?

 Sim Não às vezes

7- Quantas unidades você consome?

 1 2 3 4 5 mais de 58- Você costuma preparar salsichão de outra maneira? Sim não9- Qual? assado forno com arroz frito outros

10- Você ingere salsichão cru?

 Sim não às vezes

11- Quantas vezes você compra salsichão por mês?

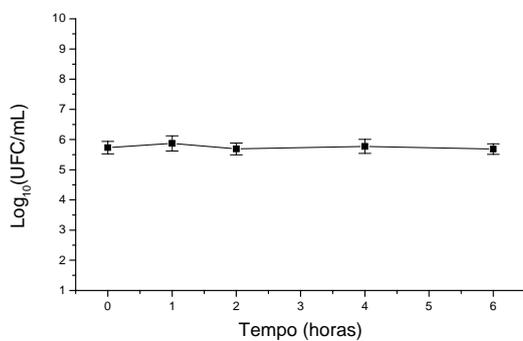
 1 2 3 4

12- Quantas vezes você vai ao supermercado por semana?

 1 2 3 4 ou mais 15 em 15 dias

Apêndice 2

A



B

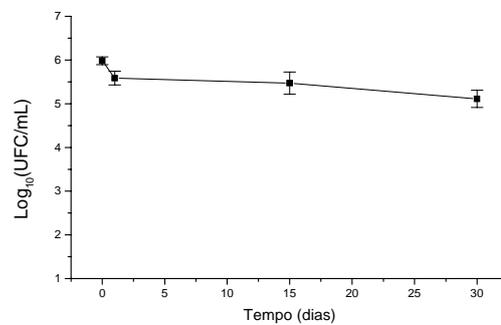


Figura 1- Curva de crescimento em temperatura ambiente, 26 á 31°C (A) e sob refrigeração, 8 á 12°C (B) do isolado se *Salmonella* Typhimurium inoculado em lingüiça frescal suína.

Apêndice 3 (Outras Produções)

**AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE FRACIONAMENTO DE PRODUTOS DE
ORIGEM ANIMAL EM SUPERMERCADOS EM PORTO ALEGRE**

EVALUATION OF PRACTICES ADOPTED FOR SLICING OF ANIMAL-
DERIVED FOODS IN SUPERMARKETS OF PORTO ALEGRE, BRAZIL

Carina Philomena Thebich Gottardi, Vanessa Daniele Mottin, Lisandra Mürmann,
Cláudia Ache Saldanha , Verônica Schimidt & Marisa Cardoso

RESUMO

Os setores de fiabreria dos supermercados e hipermercados fracionam quantidades de alimento em escala próxima à industrial, estando submetidos ao mesmo risco de manipulação e contaminação cruzada. A partir disso, o objetivo desse estudo foi avaliar as práticas adotadas para manipular produtos fracionados de origem animal. Foi conduzido um estudo observacional onde foram aplicados questionários em 37 supermercados de Porto Alegre. A maioria dos estabelecimentos contava com responsável técnico (78,4%), treinava (67,6%) e supervisionava (78,4%) os manipuladores e não tinha Manual de Boas Práticas de Fabricação (83,3%). Quanto aos procedimentos de higienização, 62,2% utilizavam protocolo de higienização que consistia em uso de detergente com posterior aplicação de sanificante para equipamentos e mesas de manipulação e 70,3% utilizavam produto específico para higienização das mãos dos manipuladores. As concentrações e freqüências adotadas para esses procedimentos eram geralmente desconhecidas. A partir disso, conclui-se que procedimentos de treinamento, controle e avaliação devem ser implementados para garantir a segurança dos alimentos manipulados nesses estabelecimentos.

Descritores: supermercado, produtos de origem animal, manipulação, condições higiênico-sanitárias.

ABSTRACT

Retail establishments, like supermarkets, process product amounts almost as high as food factories. Thus, food products processed in these establishments are exposed to the same recontamination risk as in the industrial environment. The aim of this study was to verify the environmental contamination level in supermarket areas, where animal-derived products are sliced and packed. An observational study was conducted in 37 supermarkets located in Porto Alegre (Brazil). Most establishments had a supervisor (78.4%), had training activities for the employees (67.6%) and supervising the manipulation activities (78.4%). Most (83.3%) supermarkets did not have a Good Manufacture Practice Manual. Regarding the sanitization in processing areas, 62.2% had a cleaning and disinfection protocol based on the application of a liquid detergent followed by a disinfectant, and 70% adopted a commercial product for hand antiseptis. However, the concentration of the disinfectants and the frequency of their application were not known by the employees. It was concluded that a better monitoring of

sanitization procedures in these areas have to be adopted to guarantee the safety of processed food.

Key-words: supermarkets, animal-derived products, manipulation, hygienic-sanitaries conditions.

INTRODUÇÃO

Alimento seguro é definido como aquele, onde constituintes ou contaminantes que causem mal à saúde do consumidor estão ausentes ou abaixo do limite de risco [7].

O Manual de Boas Práticas de Fabricação (BPF) é um documento que descreve as operações realizadas pelo estabelecimento, incluindo a manutenção e higienização das instalações, dos equipamentos e dos utensílios, o controle da higiene e saúde dos manipuladores, entre outros aspectos para a garantia de qualidade do alimento preparado. O Manual de BPF passou a ser exigido pela Resolução RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004 e aplica-se a todos os serviços de alimentação incluindo supermercados e congêneres [5].

O setor supermercadista brasileiro tem apresentado constante expansão, sendo responsável por parcela considerável do mercado de varejo de alimentos. Os supermercados convencionais são estabelecimentos de porte médio caracterizados pelo comércio de alimentos, ofertando uma média de 10.000 itens ao consumidor [11]. Nos últimos anos, observou-se o surgimento de lojas maiores denominadas hipermercados, onde uma média de 60.000 itens é oferecida, abrangendo alimentos e produtos têxteis e eletrônicos [9]. Nesses estabelecimentos o movimento de vendas implica no fracionamento de grande quantidade de produtos, notadamente aqueles de origem animal. Esses produtos, recebidos da indústria onde haviam sido processados sob condições controladas, são submetidos a novo risco de manipulação e contaminação cruzada no setor de fracionamento. Apesar disso, as condições higiênicas dos ambientes de fracionamento de produtos de fiambreria de supermercados é pouco estudada. Com isso, o objetivo do estudo foi avaliar as condições relacionadas às práticas de manipulação e higienização desses setores em supermercados do município de Porto Alegre.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi conduzido um estudo observacional, onde foram aplicados questionários em 37 lojas pertencentes a redes de supermercados e hipermercados considerados representativos em Porto Alegre. O questionário visou à obtenção de informações sobre as práticas de limpeza e higiene da área de manipulação de fiambres e procedimentos de fracionamento, tendo sido aplicado em todas as lojas classificadas como hipermercado ou supermercado convencional de acordo com o critério de Parente (2002) [11] e Lukianocenko (2005) [9]. As visitas foram realizadas em conjunto com a Equipe de Vigilância de Alimentos da Secretaria Municipal da Saúde de Porto Alegre. O questionário foi conduzido sempre pelo mesmo entrevistador sendo aplicado preferencialmente ao encarregado do setor de fracionamento. Foram incluídas perguntas gerais a respeito do estabelecimento tais como: número de clientes/dia, volume de produtos fatiados/dia e perguntas específicas a respeito dos protocolos de lavagem e manipulação das áreas de fatiamento. Também foi questionada a existência de responsável técnico e Manual de Boas Práticas de Fabricação. Paralelamente, o estado de conservação das mesas de manipulação, material adequado da mesa, piso e paredes, presença de sabão líquido, papel toalha foram observadas e anotadas pelo entrevistador.

RESULTADOS

Dos 37 estabelecimentos visitados, somente em um não houve a concordância em responder ao questionário. Neste estabelecimento foram considerados apenas os itens que envolviam a observação por parte do entrevistador.

Dois estabelecimentos eram centrais de fatiamento, isto é, os produtos eram fracionados e posteriormente distribuídos para várias lojas da rede. Mais da metade dos estabelecimentos que foram entrevistados (59,5%) recebia entre 1001 e 3000 clientes/dia sendo que nos cinco hipermercados eram atendidas mais de 6000 pessoas diariamente (Figura 1 A). Quanto à quantidade de produtos fatiados por dia, a maioria dos estabelecimentos processava entre 50 e 500 kg de produtos, apenas uma central de fatiamento e dois hipermercados processavam quantidades superiores (Figura 1B). Os produtos mais freqüentemente fatiados nos estabelecimentos eram queijo, presunto e outros embutidos cárnicos, que não sofrem qualquer tipo de processamento térmico posterior, sendo destinados ao pronto consumo.

Em 11 estabelecimentos (29,7%) foi informado que havia área exclusiva para a atividade de fracionamento. No entanto, encontraram-se indícios que a maioria das lojas realizava outras atividades nessa área, como o preparo de sanduíches, pizzas e outros lanches. Durante as entrevistas, pode-se constatar a presença de diversos alimentos como vegetais, pães, molhos e outros ingredientes nestas áreas.

A maioria (78,4%) das salas de fracionamento era climatizada e 62,2% informaram registrar as temperaturas aferidas em planilhas, no entanto somente 43,2% apresentavam termômetro em local visível. Em dez estabelecimentos, onde houve a aferição da temperatura ambiente, observou-se variação entre 11°C e 22°C, com média de 15,46°C.

A maioria das lojas (78,4%) contava com responsável Técnico (RT), cumprindo o que está previsto na Portaria nº 1428/MS de 1993 para estabelecimentos relacionados à área de alimentos [4]. Entretanto, 83,8% não contavam ainda com manual de BPF como previsto por BRASIL (2004) [5].

Nos 25 estabelecimentos que realizam algum tipo de treinamento para manipuladores, foram citados: curso na própria empresa ministrado pelo Responsável Técnico (RT), cursos em empresas fornecedoras, além da palestra ministrada pela Equipe de Vigilância de Alimentos da Secretaria Municipal da Saúde. No entanto, onze lojas (29,7%) ainda não ofereciam treinamento a seus funcionários. A maioria das lojas (78,4%) informou que havia supervisão dos manipuladores para o cumprimento das normas de higiene, ausência de uso de adornos e esmalte, integridade da pele e estado de saúde. Na maioria das lojas visitadas (78,4%) os manipuladores não utilizavam luvas para o processamento dos alimentos.

Em 70,3% (26) dos estabelecimentos constatou-se a presença de pessoas estranhas à atividade de fracionamento no local onde ocorria essa operação. Entre as pessoas estranhas, os promotores, isto é, funcionários das empresas fornecedoras de produtos de fiabreria, também circulavam nestas áreas.

A maioria das lojas (97,3 %) contava com mesas de manipulação com material adequado, isto é, liso, lavável, impermeável, resistente, de fácil higienização e não contaminante, estando em conformidade com a Resolução 275 de 2002 [2].

Dos estabelecimentos visitados, 59,5% tinham fatiadora de produtos de fiambreria com uso específico para queijos ou para produtos cárnicos. As lojas que utilizavam o mesmo equipamento para fracionar diferentes produtos informaram que processavam primeiro os queijos e realizavam higienização antes de fracionar os cárnicos. No entanto, não higienizavam a fatiadora entre diferentes produtos cárnicos, pois consideravam não haver necessidade, uma vez que os ingredientes eram os mesmos.

As informações obtidas pelo questionário demonstraram que, para a higienização de equipamentos e mesas de manipulação, a maioria dos estabelecimentos (62,2%) utilizava detergente com posterior aplicação de um sanificante, geralmente a base de hipoclorito de sódio (Tabela 1). O responsável pela higienização era o manipulador que estava encarregado de realizar os procedimentos previstos no protocolo imediatamente após o uso do equipamento. No entanto, quando questionada sobre a frequência da realização dos procedimentos, a grande parte dos entrevistados não soube informar, relatando que a higienização era feita no final do turno e sempre que necessário, indicando que não havia uma padronização nesse procedimento.

Para higienização das mãos dos manipuladores, 70,3% dos estabelecimentos utilizava produto específico para este fim, indicado por uma empresa fornecedora de produtos de limpeza, a base de 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil. Quanto à frequência de higienização das mãos, verificou-se que semelhante ao caso dos equipamentos, não havia padronização.

A respeito da concentração dos produtos utilizados, a maioria dos entrevistados relatou que utilizava aquela recomendada pelo fabricante. No entanto, foi verificado que as respostas dadas nessa etapa não correspondiam aos procedimentos realmente adotados na rotina. Em duas lojas amostradas, os produtos citados no questionário não estavam presentes no setor de fracionamento, estando em seu lugar detergente neutro comum. Em outra loja que relatou na entrevista que usava o protocolo detergente com posterior aplicação de sanificante, observou-se o uso exclusivo de álcool em concentração desconhecida. Nesse sentido, observou-se que a maioria dos estabelecimentos não seguia uma concentração previamente definida dos produtos utilizados.

DISCUSSÃO

As entrevistas conduzidas no presente estudo demonstram a parcela importante da população atendida pelos estabelecimentos visitados, bem como o volume de alimentos manipulados. Isto enfatiza a importância desse tipo de estabelecimento comercial para garantia da segurança dos alimentos consumidos pela população e a abrangência potencial de contaminações que venham a ocorrer em produtos por eles manipulados.

A quantidade de produtos fracionados, acima de 100 Kg diariamente na maioria dos estabelecimentos, é comparável ao volume processado em escala industrial. Entretanto, ao contrário das indústrias sob inspeção federal e estadual, muitas vezes não existem Procedimentos Operacionais Padrão (POP), Procedimento-padrão de Higiene Operacional (PPHO) ou programas de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) estabelecidos. Constata-se, ainda, que não há uma regulamentação sanitária específica para setores de fracionamento de estabelecimentos desse porte.

Os resultados obtidos demonstram que a maioria dos estabelecimentos visitados respeitava os itens previstos em regulamentações existentes para a comercialização de alimentos. Nesse sentido, a maioria das lojas contava com Responsável Técnico, realizava algum tipo de treinamento para os funcionários, supervisionava os manipuladores quanto às normas de higiene e estado de saúde e tinha estrutura de ambiente e superfície de manipulação de alimentos de acordo com a legislação vigente [4; 13; 2].

Apenas a existência de Manual de BPF, também exigido pela legislação [5], não era cumprida pela maioria dos estabelecimentos. Entretanto a realização dos questionários coincidiu com o período previsto para a vigência da lei e, por isso estava em fase de implementação na maioria dos estabelecimentos. Segundo a legislação vigente, os serviços de alimentação devem dispor do Manual de BPF, o qual deve estar acessível aos funcionários envolvidos e disponível às autoridades sanitárias, quando requerido.

Na prática, o Manual de BPF é o documento que descreve todas as ações previstas em programa de Boas Práticas de Fabricação, o qual deve ter sido implantado no estabelecimento que fabrica ou comercializa alimentos. As normas que estabelecem as chamadas BPF, por sua vez, envolvem requisitos fundamentais,

inclusive regras de higiene pessoal e de limpeza do local de trabalho [10]. Justamente nesses aspectos observa-se que houve a concentração das falhas observadas no presente estudo.

A evidente ausência de padronização no que diz respeito aos procedimentos adotados para o fracionamento dos alimentos, como a existência, no ambiente de manipulação, de pessoas e produtos estranhos ou a inexistência de um procedimento padronizado e cronograma na utilização de equipamentos de fracionamento, podem favorecer a contaminação cruzada de alimentos [14; 3]. Além disso, podem propiciar a transferência de agentes causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) que podem estar aderidos às superfícies comumente encontradas em plantas de processamento de alimentos, formando biofilmes [8].

Os aspectos relacionados à higienização de equipamentos e manipuladores também demonstrou estar aquém do requerido para garantir um alimento seguro. Apesar de a maioria dos estabelecimentos adotar o uso de detergente associado à sanificante a base de hipoclorito de sódio, como é largamente utilizado na indústria de alimentos [1], a concentração adotada e a frequência de utilização eram desconhecidas pelos operadores. Quanto à higienização das mãos a mesma situação foi constatada, indicado que a transferência de patógenos por manipuladores poderia ocorrer. Esse é um aspecto relevante, pois a ausência de lavagem das mãos ou higienização deficiente têm sido apontadas como causas da transferência de patógenos para alimentos manipulados [12], tornando esse procedimento de fundamental importância nos estabelecimentos que processam alimentos [6].

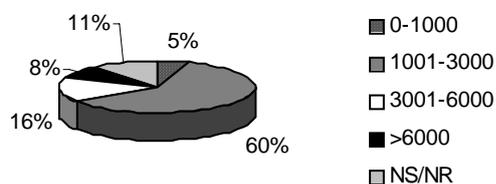
A elaboração do Manual de BPFs certamente poderá contribuir para a correção dos aspectos deficientes que foram constatados, entretanto é preciso que o mesmo seja resultado de um programa de BPF implantado. Caso contrário será apenas um documento desconhecido e pouco utilizado pelos manipuladores de alimentos. Para tanto, gerências, chefias e supervisão devem estar engajadas para que ocorra o êxito do programa, bem como ações para motivação e treinamento de funcionários precisam ser estabelecidos [10].

Em conclusão, os resultados obtidos demonstram a importância da fiscalização e orientação realizadas nesses estabelecimentos, uma vez que a população potencialmente exposta a um possível agente causador de DTA veiculado por produtos manipulados nesses locais é extremamente elevada.

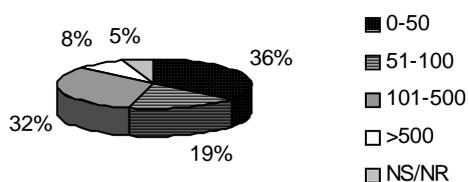
REFERÊNCIAS

- 1 **Andrade N. J. & Macêdo J.A. 1996.** *Higienização na Indústria de Alimentos*. São Paulo: Varela, 182p.
- 2 **ANVISA. 2002.** Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/appcc.htm>. Acessado em 07/10/2005.
- 3 **Banatvala N., Magnano A.R., Cartter M.L., Barrett T.J., Bibb W.F., Vasile L.L., Mshar P., Lambert-Fair M.A., Green J.H., Bean N.H. & Tauxe R.V. 1996.** Meat grinders and molecular epidemiology: two supermarket outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 173: 480-483.
- 4 **Brasil. 1993.** Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Portaria nº 1428/MS, de 26 de novembro de 1993*. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1428_93.htm. Acessado em 22/11/2003.
- 5 **Brasil. 2004.** Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução: RDC nº216 de 15 de setembro de 2004*. Dispõe sobre: *Regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado em: 18/11/2004.
- 6 **Chen Y., Jackson K.M., Chea F.P. & Schaffner D.W. 2001.** Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*. 64: 72-80.
- 7 **Franco B.D.G.M. & Landgraf M. 1996.** *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 181p.
- 8 **Kaneko K.I., Hayashidani H. Takahashi T., Shiraki Y., Wongpranne S.L. & Ogawa M. 1999.** Bacterial contamination in the environmental of food factories processing ready-to-eat fresh vegetables. *Journal of Food Protection*. 62: 800-804.

- 9 **Lukianocenko M. 2005.** A evolução nos formatos continua. *Superhiper*. 357: 18-20.
- 10 **Nascimento G.A. & Barbosa J.S. 2007.** BPF: Boas práticas de fabricação: uma revisão. *Higiene Alimentar*. 21: 24-30.
- 11 **Parente J. 2000.** *Varejo no Brasil: gestão e estratégia*. São Paulo: Atlas, 388p.
- 12 **Reij M.W. & Den Aantrekker E.D. 2004.** Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*. 91: 1-11.
- 13 **Rio Grande do Sul. 2001.** Governo do Estado. Secretaria da administração e dos recursos humanos. Decreto nº 23430 *Regulamento sobre a promoção, proteção e recuperação da saúde pública*. Porto Alegre: CORAG. 400p.
- 14 **Scott E. & Bloomfield S. 1990.** The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. *Journal of Applied Bacteriology*. 68: 271-278.



A



B

Figura 1: Distribuição dos estabelecimentos onde foram aplicados os questionários, de acordo com o número de clientes atendidos por dia (A) e de acordo com a quantidade (kg) de produtos fracionados por dia (B).

Tabela 1: Tipos de protocolos de higienização adotados para ambiente e manipuladores de alimentos adotados em 37 supermercados e hipermercados de Porto Alegre.

Protocolo	Equipamento/Mesas (%)	Mãos (%)
Detergente	13,5	24,3
Detergente e sanificante	62,2	0
Detergente e vinagre	2,7	0
Detergente e álcool	18,9	2,7
Produto específico*	0	70,3
NR/NS**	2,7	2,7
Total	100	100

* Produto comercial a base de 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil.

** NS/NR: não sabe ou não respondeu

OUTRAS PRODUÇÕES REALIZADA DURANTE O DOUTORADO

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (completo)

MÜRMAN, L., SANTOS, M.C., CORBELLINI, L. G., CARDOSO.M.
Análise de risco quantitativa da presença de *Salmonella* sp.em lingüiça frescal suína: dados preliminares In: 13 Congresso da ABRAVES, 2007, Florianópolis.
13 Congresso da ABRAVES. , 2007.

MÜRMAN, L., SANTOS, M.C., MOTTIN, V.D., CARDOSO.M.
Avaliação do crescimento de diferentes sorovares de *Salmonella* em temperatura ambiente de refrigeração In: III Congresso Latino Americano e IX Congresso Brasileiro de Hgiene de Alimentos, 2007, Porto Seguro.
III Congresso Latino Americano e IX Congresso Brasileiro de Higiene de Alimentos , 2007.

MOTTIN, V.D., FISH, MÜRMAN, L., CARDOSO.M.
Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* em embutidos de carne suína cozidos e fatiados comercializados em supermercados no município de Porto Alegre/RS In: III Congresso Latino Americano e IX Congresso Brasileiro de Higiene de Alimentos, 2007, Porto Seguro/BA.
III Congresso Latino Americano e IX Congresso Brasileiro de Higiene de Alimentos , 2007.

MÜRMAN, L., SANTOS, M.C., CARDOSO.M.
Resistência térmica de isolados pertencentes a diferentes sorovares de *Salmonella* provenientes de lingüiça frescal suína In: 13 Congresso da ABRAVES, 2007, Florianópolis.
13 Congresso da ABRAVES. , 2007.

MÜRMAN, L., SANTOS, M.C., CARDOSO.M.
Prevalence and level of *Salmonella* enterica in pork fresh sausages purchased in southern Brazil. In: 13S International Symposium Salmonella and Salmonellosis., Sain Malo.
13S International Symposium Salmonella and Salmonellosis. , 2005. p.443 – 444

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

MÜRMAN, L., MOTTIN, V.D., MALLMANN, C A
Organização Sanitária em estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de Santa Maria, RS In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA)., 2006, Curitiba.
XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA). , 2006.

MÜRMAN, L., SANTOS, M.C., CARDOSO.M.
Prevalência e nível de contaminação de *Salmonella enterica* em lingüiça frescal de

carne suína em Porto Alegre/RS In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA)., 2006, Curitiba.

XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA). , 2006.

MÜRMAN, L., SANTOS, M.C., CARDOSO.M.

Quantificação e perfil genotípico de *Salmonella* entérica presente em alimentos envolvidos em surtos de salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA)., 2006, Curitiba.

XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA). , 2006.

SANTOS, M.C., MÜRMAN, L., CARDOSO.M.

Quantificação, perfil genotípico e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella enterica* presente em alimentos envolvidos em surtos de salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul. In: XVIII Salão de Iniciação Científica XV Feira de Iniciação Científica.

XVIII Salão de Iniciação Científica XV Feira de Iniciação Científica. Livro de Resumos. , 2006. p.137 - 137

SANTOS, M.C., MÜRMAN, L., CARDOSO.M.

Quantificação de *Salmonella* sp. presente em alimentos envolvidos em surtos de salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul. In: XVII Salão de Iniciação Científica XIV Feira de Iniciação Científica., Porto Alegre.

Livro de resumos. Porto Alegre: , 2005. p.158 - 158

Artigos aceitos para publicação

1. MÜRMAN, Lisandra, SANTOS, Maria Cecília dos, CARDOSO, Marisa
Curvas de crescimento e destruição térmica de sorovares de *Salmonella* sp. isolados de lingüiça frescal de carne suína. Acta Scientiae Veterinariae. , 2008.

2.GOTTARDI, Carina, MOTTIN, Vanessa Danielle, MÜRMAN, Lisandra, CARDOSO, Marisa
Avaliação das práticas de fracionamento de produtos de origem animal em supermercados em Porto Alegre. Acta Scientiae Veterinariae. , 2008

Artigos submetidos para publicação

1. MÜRMAN, Lisandra, SANTOS, Maria Cecília dos, CARDOSO, Marisa
Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. Food Control. , 2008.

2. MÜRMAN, Lisandra, SANTOS, Maria Cecília dos, CARDOSO, Marisa
Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. , 2008.

Outras Produções

MÜRMAN, L. Análise de risco quantitativa da presença de *Salmonella* sp. em lingüiça frescal suína: dados preliminares, 2007. Palestra ministrada- ABRAVES.

MÜRMAN, Lisandra
Pragas em Serviços de Alimentação. 2005, 2006, 2007. (Palestra para Curso de Nutrição- UFRGS)

MÜRMAN, Lisandra
Tópicos Atuais em Inocuidade dos Alimentos, 2006. (Palestra ministrada no Programa de Educação Médica Continuada)

MÜRMAN, Lisandra.
Seminário sobre *Salmonella* em suínos: resultados de pesquisa e perspectivas. 2006. Palestra ministrada na EMBRAPA- Concórdia.

MÜRMAN, Lisandra
Avaliação de Risco em Alimentos, 2006. (Palestra para Curso de Nutrição- UFRGS)

MÜRMAN, Lisandra
Controle de Roedores, 2004, 2005, 2006. (Palestra ministrada –Curso de Medicina Veterinária. UFRGS)

MÜRMAN, Lisandra
O Papel do Médico Veterinário na Saúde Pública, 2004. (Palestra ministrada na Semana Acadêmica da Medicina Veterinária- UFSM).

MÜRMAN, Lisandra
Atividade de extensão universitária no laboratório de Medicina Veterinária Preventiva /FAVET/ UFRGS, 2004, 2005, 2006, 2007.