

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
DOUTORADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO  
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**JORGE LUIZ FORTUNA**

**PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM HAMBÚRGUER CRU  
UTILIZANDO A METODOLOGIA MICROBIOLÓGICA  
CONVENCIONAL, O MÉTODO SALMOSYST E O MÉTODO DE  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.**

**UNIVERSIDADE  
FEDERAL  
FLUMINENSE**

Niterói – RJ  
2013

**JORGE LUIZ FORTUNA**

**PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM HAMBÚRGUER CRU UTILIZANDO A  
METODOLOGIA MICROBIOLÓGICA CONVENCIONAL, O MÉTODO  
SALMO SYST E O MÉTODO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. *Dr.* Robson Maia Franco

Co-orientador: Prof. *Dr.* Elmiro Rosendo do Nascimento

Niterói – RJ  
2013

**F745 Fortuna, Jorge Luiz**

Pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrguer cru utilizando a metodologia microbiológica convencional, o método Salmosyst e o método de reação em cadeia da polimerase / Jorge Luiz Fortuna; orientador Robson Maia Franco. – 2013.  
228 f.

Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense, 2013.  
Orientador: Robson Maia Franco

1. Hambúrguer. 2. *Salmonella*. 3. Contaminação da carne. 4. Reação em cadeia da polimerase.  
I. Título.

**CDD 664.07**

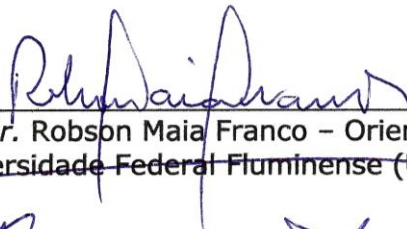
**JORGE LUIZ FORTUNA**

**PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM HAMBÚRGUER CRU UTILIZANDO A  
METODOLOGIA MICROBIOLÓGICA CONVENCIONAL, O MÉTODO  
SALMOSYST E O MÉTODO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.**

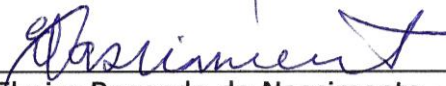
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovado em 04 de abril de 2013.

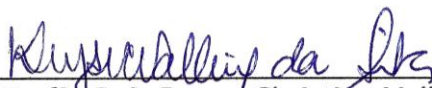
**BANCA EXAMINADORA**



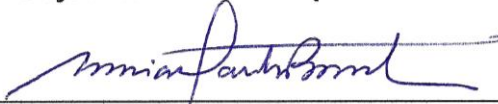
Prof. Dr. Robson Maia Franco – Orientador  
Universidade Federal Fluminense (UFF)



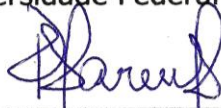
Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento – Coorientador  
Universidade Federal Fluminense (UFF)



Profª/Drª. Deyse Christina Vallim da Silva  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-IOC)



Prof. Dr. Luciano Santos Bersot  
Universidade Federal do Paraná (UFPR)



Profª. Drª. Karen Signori Pereira  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dedico este trabalho aos amores da minha vida. Minha amiga, companheira, amante e amada esposa Danielle e ao meu presente divinal, meu idolatrado e amado filho Pedro Jorge.

*“Filho é um ser que nos emprestaram para um curso intensivo de como amar alguém além de nós mesmos, de como mudar nossos piores defeitos para darmos os melhores exemplos e de aprendermos a ter coragem. Isto mesmo! Ser pai ou mãe é o maior ato de coragem que alguém pode ter, porque é se expor a todo tipo de dor, principalmente da incerteza de estar agindo corretamente e do medo de perder algo tão amado. Perder? Como? Não é nosso, recordam-se?*

*Foi apenas um empréstimo!”*

José de Souza Saramago (1922-2010)

Escritor Português

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus (Zambi/Olorum), ao nosso Pai Oxalá e a todos os Orixás e Guias benfeitores pela iluminação e encaminhamento em todos os momentos, pois sem as Suas forças, nada seria possível.

Aos meus saudosos e amados pais (*in memorium*), minha mãe Ivanira de Souza Fortuna e meu pai Germano Luiz Fortuna, pois tudo que sou, tudo que tenho, tudo que sei, devo a eles que tudo me deram com muito amor.

A minha amada esposa e companheira Danielle Barros Silva Fortuna por sua paciência, cumplicidade e amor incondicional em mais uma etapa de nossas vidas.

Ao meu idolatrado filho Pedro Jorge Barros Fortuna, simplesmente por sua existência em minha vida, pois tudo agora faz sentido.

A minha querida sogra Ana Barros Silva, pois nesta longa caminhada me ajudou em todos os momentos, com sua devoção, amor e principalmente paciência. Obrigado por cuidar do meu herdeiro – e seu neto – nos momentos de minha ausência.

Aos meus amados irmãos Júlio César Fortuna e Germano Augusto Fortuna, pelo companheirismo, amor e principalmente pelo verdadeiro significado da palavra fraternidade.

Ao meu orientador e principalmente amigo, Prof. Dr. Robson Maia Franco, pela amizade, experiência, dedicação e paciência.

Ao meu coorientador e recente amigo, Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento, pelas observações e contribuições.

Aos meus amigos de graduação Deyse Christina Vallim e Luciano Santos Bersot, hoje respeitadas professoras e pesquisadores em suas respectivas instituições,

por aceitarem o convite de serem membros da minha Banca de Qualificação e de Tese.

Aos meus queridos amigos e compadres Marcello Campos Valverde; Marcelo Silva Madureira e Vinicius Cunha Barcellos. Que a amizade seja eterna!!

A todos os amigos e colegas pela convivência quase que diária no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária, especialmente para Vinicius Alves, Stefani Faro, Raquel Sant'Anna, Patrícia Baldino, Michele Nana, Bruno Costa Lima, Anna Canto, Cesar Lazaro e Eduardo Nogueira.

A todos do Laboratório de Epidemiologia Molecular pela oportunidade, especialmente à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virginia Léo de Almeida Pereira e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dayse Lima da Costa Abreu e aos colegas Liana Lumi, Mariane Verinaud, Hugo Lopes e Leandro Machado.

Aos sempre solícitos e amigos secretários da Coordenação da Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Dráusio de Paiva Ferreira; André Luiz da Silva Veiga e Mariana de Oliveira.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Educação do *Campus X*, em Teixeira de Freitas-BA, da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), pela amizade, paciência, dedicação e amor à Educação e à Ciência.

A todos os educadores e professores que lutam por uma sociedade mais justa e digna.

A todos os colegas e amigos, que direta e/ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Educação do *Campus X* da UNEB, por permitir meu afastamento para a dedicação exclusiva ao Doutorado.

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Ensino de Pós-Graduação (PPG) da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), pelo apoio financeiro através do Programa de Apoio à Capacitação (PAC/UNEB).

A todos aqueles que lutam por um Mundo mais justo e digno, em que possamos viver independente de religião, crença, raça, sexo, nível sócio-econômico, ou qualquer outra forma de discriminação.

Aos grandes gênios expoentes das suas respectivas áreas de ciências, saúde, educação, filosofia, pintura, poesia e literatura: Leonardo da Vinci, Michelangelo, Antonie Van Leeuwenhoek, Voltaire, Auguste Comte, Louis Pasteur, Robert Koch, Vincent Van Gogh, Hans Christian Gram, Alexander Fleming, Tarsila do Amaral, Oswaldo Cruz, Carlos Chagas, Florbela Espanca, Lev Vygotsky, Jean Piaget, Cândido Portinari, Jorge Amado, Paulo Freire, Darcy Ribeiro, Rubem Alves e Marcelo Gleiser. Pois estes sempre me influenciarão na construção eterna do meu SER.

A Joana D'Arc, Manuela Sáenz, Simón Bolívar, Anita Garibaldi, Giuseppe Garibaldi, Ernesto Che Guevara, Olga Benário Prestes, Luís Carlos Prestes, Carlos Lamarca, Carlos Marighella, Chico Mendes e tantos outros que lutaram contra a opressão, dando suas vidas pela liberdade, igualdade, fraternidade e humanidade.



## **AQUARELA**

*(Toquinho – Vinicius de Moraes – M. Fabrizio – G. Morra)*

*Numa folha qualquer eu desenho um sol amarelo  
E com cinco ou seis retas é fácil fazer um castelo.  
Corro o lápis em torno da mão e me dou uma luva,  
E se faço chover, com dois riscos tenho um guarda-chuva.*

*Se um pinguinho de tinta cai num pedacinho azul do papel,  
Num instante imagino uma linda gaivota a voar no céu.  
Vai voando, contornando a imensa curva Norte e Sul,  
Vou com ela, viajando, Havaí, Pequim ou Istambul.  
Pinto um barco a vela branco, navegando, é tanto céu e mar num beijo azul.*

*Entre as nuvens vem surgindo um lindo avião rosa e grená.  
Tudo em volta colorindo, com suas luzes a piscar.  
Basta imaginar e ele está partindo, sereno, indo,  
E se a gente quiser ele vai pousar.*

*Numa folha qualquer eu desenho um navio de partida  
Com alguns bons amigos bebendo de bem com a vida.  
De uma América a outra consigo passar num segundo,  
Giro um simples compasso e num círculo eu faço o mundo.*

*Um menino caminha e caminhando chega no muro  
E ali logo em frente, a esperar pela gente, o futuro está.  
E o futuro é uma astronave que tentamos pilotar,  
Não tem tempo nem piedade, nem tem hora de chegar.  
Sem pedir licença muda nossa vida, depois convida a rir ou chorar.*

*Nessa estrada não nos cabe conhecer ou ver o que virá.  
O fim dela ninguém sabe bem ao certo onde vai dar.  
Vamos todos numa linda passarela  
De uma aquarela que um dia, enfim, descolorirá.*

*Numa folha qualquer eu desenho um sol amarelo (que descolorirá).  
E com cinco ou seis retas é fácil fazer um castelo (que descolorirá).  
Giro um simples compasso e num círculo eu faço o mundo (que descolorirá).*

## SUMÁRIO

**LISTA DE TABELAS**, p. 13

**LISTA DE FIGURAS**, p. 15

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**, p. 18

**RESUMO**, p. 22

**ABSTRACT**, p. 23

**1 INTRODUÇÃO**, p. 24

**2 REVISÃO DE LITERATURA**, p. 28

2.1 HAMBÚRGUER, p. 28

2.2 PADRÃO MICROBIOLÓGICO DO HAMBÚRGUER, p. 29

2.3 *Salmonella* spp., p. 30

**2.3.1 Classificação**, p. 30

**2.3.2 Características**, p. 34

**2.3.3 Estrutura celular**, p. 35

2.4 DOENÇAS CAUSADAS POR SALMONELAS – SALMONELOSES, p. 37

**2.4.1 Febre tifóide e febres entéricas**, p. 39

**2.4.2 Patogenia e patologia das enterocolites por salmonelas**, p. 39

**2.4.3 Epidemiologia**, p. 42

**2.4.4 Principais alimentos contaminados por salmonelas**, p. 45

**2.4.5 Fatores que favorecem a contaminação dos alimentos por salmonelas**, p. 47

**2.4.6 Prevenção e controle das doenças causadas por salmonelas**, p. 48

2.5 PESQUISA DE *Salmonella* spp. ATRAVÉS DA METODOLOGIA CONVENCIONAL, p. 49

**2.5.1 Pré-enriquecimento em caldo não seletivo**, p. 51

**2.5.2 Enriquecimento em caldo seletivo**, p. 52

**2.5.3 Plaqueamento seletivo diferencial (isolamento e seleção)**, p. 54

**2.5.4 Identificação bioquímica**, p. 56

- 2.5.5 Provas bioquímicas complementares**, p. 56
- 2.5.6 Prova de soroaglutinação (sorologia)**, p. 56
- 2.6 SISTEMA BACTRAY®, p. 56
- 2.7 PESQUISA DE *Salmonella* spp. ATRAVÉS DE MEIOS CROMOGÊNICOS, p. 57
- 2.8 PESQUISA DE *Salmonella* spp. ATRAVÉS DO MÉTODO SALMOSYST, p. 59
- 2.9 CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS, p. 60
- 2.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, p. 61
  - 2.10.1 Reação em cadeia da polimerase para detecção de microrganismos em alimentos**, p. 61
  - 2.10.2 Pesquisa de *Salmonella* spp. utilizando a reação em cadeia da polimerase**, p. 63
- 2.11 AGENTES ANTIMICROBIANOS, p. 64
  - 2.11.1 Utilização de agentes antimicrobianos**, p. 64
  - 2.11.2 Resistência de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos**, p. 66
  - 2.11.3 Mecanismo de resistência**, p. 67
- 2.12 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS, p. 69
  - 2.12.1 Método de difusão em disco**, p. 69
  - 2.12.2 Meio de Ágar Müller-Hinton**, p. 70
  - 2.12.3 Discos de antimicrobianos**, p. 70
  - 2.12.4 Preparação do inóculo; inoculação das placas e colocação dos discos**, p. 71
  - 2.12.5 Interpretação dos resultados**, p. 72
- 3 DESENVOLVIMENTO**, p. 74
  - 3.1 METODOLOGIA, p. 74
    - 3.1.1 Local; área do estudo e coletas de amostras**, p.74
    - 3.1.2 Temperatura dos balcões de exposição e dos hambúrgueres**, p.74
    - 3.1.3 Análises laboratoriais**, p. 75
      - 3.1.3.1 Preparo do material e dos meios de cultura, p. 76
    - 3.1.4 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas**, p. 76
      - 3.1.4.1 Diluições seriais decimais, p. 76
      - 3.1.4.2 Método de contagem padrão de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em placas, p. 76
    - 3.1.5 Pesquisa de *Salmonella* spp.**, p. 77

3.1.5.1	Microbiologia convencional,	p. 78
3.1.5.1.1	<i>Pré-enriquecimento,</i>	p. 78
3.1.5.1.2	<i>Enriquecimento,</i>	p. 78
3.1.5.1.3	<i>Plaqueamento seletivo,</i>	p. 79
3.1.5.1.4	<i>Triagem primária (identificação bioquímica),</i>	p. 80
3.1.5.1.5	<i>Triagem secundária (provas bioquímicas complementares),</i>	p. 81
3.1.5.1.6	<i>Prova de soroaglutinação (sorologia),</i>	p. 83
3.1.5.1.7	<i>Características morfológicas,</i>	p. 84
3.1.5.2	Sistema Bactray® I e II,	p. 84
3.1.5.3	Método Salmosyst,	p. 85
3.1.5.4	Reação em cadeia da polimerase,	p. 86
3.1.5.4.1	<i>Protocolo da reação em cadeia da polimerase,</i>	p. 86
3.1.5.4.1.1	<i>Extração do DNA,</i>	p. 87
3.1.5.4.1.2	<i>Amplificação do DNA,</i>	p. 87
<b>3.1.6</b>	<b>Teste de sensibilidade aos antimicrobianos,</b>	p. 88
<b>3.1.7</b>	<b>Desenho analítico e análise estatística,</b>	p. 90
3.1.7.1	Tipo de estudo e tratamentos estatísticos,	p. 90
3.1.7.2	Cálculo da amostragem,	p. 90
3.1.7.3	Teste do Qui-quadrado,	p. 91
3.1.7.4	Coeficiente de correlação de Pearson e de Spearman,	p. 91
3.1.7.5	Regressão linear e logística,	p. 93
3.1.7.6	Teste de McNemar,	p. 94
3.1.7.7	Testes diagnósticos,	p. 94
3.1.7.8	<i>Odds Ratio,</i>	p. 95
3.1.7.9	Teste de Student (teste <i>t</i> ),	p. 95
<b>3.1.8</b>	<b>Análise de similaridade,</b>	p. 95
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO,	p. 96
<b>3.2.1</b>	<b>Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em hambúrgueres,</b>	p. 96
<b>3.2.2</b>	<b>Métodos microbiológicos,</b>	p. 98
<b>3.2.3</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase,</b>	p. 101
<b>3.2.4</b>	<b>Comparação entre os métodos microbiológicos e a PCR,</b>	p. 107
<b>3.2.5</b>	<b>Comparação entre a sorologia e o sistema Bactray®,</b>	p. 111
<b>3.2.6</b>	<b>Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas,</b>	p. 112
<b>3.2.7</b>	<b>Temperaturas dos balcões frigoríficos e dos hambúrgueres,</b>	p. 114

**3.2.8 Correlação entre contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de *Salmonella* spp., p. 117**

**3.2.9 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos, p. 121**

**3.3 ARTIGOS, p.130**

**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 211**

**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 215**

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Tolerância máxima e padrões microbiológicos, estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para hambúrgueres, p. 30
- TABELA 2** Características dos grupos filogenéticos do gênero *Salmonella*, p. 32
- TABELA 3** Esquema abreviado de Kaufmann e White para a classificação de *Salmonella* spp. contendo os sorotipos de maior significado clínico, p. 33
- TABELA 4** Distribuição de casos confirmados notificados de salmonelose humana por 10 diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. mais frequentes nos países da União Europeia (2010-2011), p. 45
- TABELA 5** Número de *Salmonella* spp. detectadas nas amostras analisadas de hambúrgueres de carne bovina e misto (carne bovina e carne de frango), p. 97
- TABELA 6** Número de amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp. conforme o método microbiológico utilizado e o tipo de hambúrguer, p. 99
- TABELA 7** Número de amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp. de acordo com o método microbiológico utilizado, evidenciando as amostras que foram positivas em ambos os métodos, p. 99
- TABELA 8** Resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus através da reação em cadeia da polimerase de acordo com os diferentes Caldos de pré-enriquecimento e tempos de incubação, p. 102
- TABELA 9** Número de amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp. de acordo com o tipo de Caldo utilizado, evidenciando as amostras que foram positivas em ambos os Caldos, p. 103

- TABELA 10** Número de *Salmonella* spp. detectadas nas amostras de hambúrgueres de carne bovina e misto (carne bovina e carne de frango) analisadas pela PCR, p. 104
- TABELA 11** Número de amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp. conforme o tipo de Caldo utilizado e o tipo de hambúrguer, p. 105
- TABELA 12** Número de amostras positivas para *Salmonella* spp. detectadas pelos métodos microbiológicos (convencional e Salmosyst) e pela reação em cadeia da polimerase, de acordo com o tipo de hambúrguer, p. 108
- TABELA 13** Número de amostras positivas para *Salmonella* spp. detectadas pelos métodos microbiológicos (convencional e Salmosyst) e pela reação em cadeia da polimerase, p. 108
- TABELA 14** Número de amostras que se encontravam fora dos padrões em relação a contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas e temperaturas dos balcões e dos hambúrgueres, com suas respectivas médias e desvios padrões (DP), p. 113
- TABELA 15** Correlação entre os resultados encontrados na contagem padrão de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de *Salmonella* spp. nos hambúrgueres crus analisados, p. 118
- TABELA 16** Frequência absoluta e relativa da sensibilidade das 45 cepas de *Salmonella* spp. isoladas nos hambúrgueres, em relação aos 12 diferentes antimicrobianos testados, p. 121
- TABELA 17** Frequência absoluta e relativa da sensibilidade das cepas de *Salmonella* spp. isoladas nos hambúrgueres de carne bovina e nos hambúrgueres misto, em relação aos 12 diferentes antimicrobianos testados, p. 123
- TABELA 18** Caracterização das 45 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de hambúrgueres de acordo com o tipo de hambúrguer, método microbiológico utilizado e perfil de resistência com a identificação dos antimicrobianos testados, p. 125

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Esquema do processamento do hambúrguer, p. 29
- FIGURA 2** Esquema geral das análises laboratoriais para detecção de *Salmonella* spp., p. 75
- FIGURA 3** Ágar Hektoen (HE) contendo colônias típicas de *Salmonella* spp. – cor azul-esverdeada (verde-azulado) com ou sem precipitado preto (produção de H<sub>2</sub>S), p. 79
- FIGURA 4** Ágar *Salmonella-Shigella* (SS) contendo colônias típicas de *Salmonella* spp. – colônias incolores com ou sem precipitado preto (produção de H<sub>2</sub>S), p. 79
- FIGURA 5** Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) contendo colônias típicas de *Salmonella* spp. – colônias translúcidas com ou sem precipitado preto (H<sub>2</sub>S) e acidez do meio (amarelo). Colônias com cor laranja suspeitas de *Salmonella* Typhi, p. 80
- FIGURA 6** Ágar *Salmonella* Diferencial (ASD) contendo colônias típicas de *Salmonella* spp. – cor vermelha ou rosa, indicando produção do Ácido Glicolpropileno, p. 80
- FIGURA 7** Triagem Primária com seus respectivos pares de tubos de TSI e LIA característicos para *Salmonella* spp. **A (TSI/LIA Típicos):** TSI com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho); LIA com fundo e bisel alcalino (púrpura). *Salmonella* spp. típica. **B (TSI/LIA Atípicos 1):** TSI com fundo e bisel ácido (amarelo); LIA com fundo e bisel alcalino (púrpura). *Salmonella* spp. atípica. **C (TSI/LIA Atípicos 2):** TSI com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho); LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura). *Salmonella* Paratyphi, p. 81
- FIGURA 8** Teste da produção da urease. A *Salmonella* spp. não produz urease (-), p. 82
- FIGURA 9** Teste da desaminação da fenilalanina. A *Salmonella* spp. não desamina a fenilalanina (-), p. 83



- FIGURA 10** Soroaglutinação positiva (presença de aglutinação) para *Salmonella* spp., p. 84
- FIGURA 11** Microfotografia de bastonetes Gram-negativos, típicos de *Salmonella* spp., observados utilizando-se um microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000X), p. 84
- FIGURA 12** Utilização do Halômetro para medir o diâmetro do halo de inibição, p. 89
- FIGURA 13** Gel de agarose de eletroforese do produto da PCR a partir do gene *invA*. **8**: marcador de pares de base (100pb); **7**: controle positivo (*Salmonella* Enteritidis) (seta azul); **9**: controle negativo; **2, 3, 5, 6, 10**: amostras positivas (284pb) (seta amarela); **1, 4, 11, 12, 13, 14**: amostras negativas, p. 103
- FIGURA 14** Número de amostras positivas para *Salmonella* spp. a partir dos métodos microbiológicos (convencional+Salmosyst) e da PCR, p. 107
- FIGURA 15** Resultados positivos para a identificação de *Salmonella* spp. em hambúrgueres utilizando a sorologia e o sistema Bactray<sup>®</sup>, p. 111
- FIGURA 16** Temperaturas dos balcões frigoríficos, temperaturas dos hambúrgueres e enumeração das bactérias aeróbias mesófilas (log UFC/g) , p. 113
- FIGURA 17** Correlação entre as temperaturas dos hambúrgueres e as temperaturas dos balcões frigoríficos, p. 116
- FIGURA 18** Correlação entre o número de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e as temperaturas dos balcões frigoríficos, p. 116
- FIGURA 19** Correlação entre o número de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e as temperaturas dos hambúrgueres, p. 117
- FIGURA 20** Gráfico de regressão com linha de tendência e valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e correlação ( $r$ ), p. 120
- FIGURA 21** Frequência da sensibilidade das 45 cepas de *Salmonella* spp. isoladas nos hambúrgueres, em relação aos 12 diferentes antimicrobianos testados, p. 122

**FIGURA 22** Cladograma de similaridade entre as cepas de *Salmonella* spp. isoladas de hambúrgueres de carne bovina e hambúrgueres mistos (carne bovina e carne de frango), produzido pelo programa *WinClada*<sup>®</sup>, p. 129

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

-	Negativo / Menos
%	Por Cento; Porcentagem
±	Mais ou Menos
+	Positivo / Mais
®	Marca Registrada
°	Grau(s)
°C	Grau(s) Celsius
4F	Quatro "Efes" ("Food"; "Fingers"; "Feces"; "Flies")
a <sub>a</sub>	Atividade de Água
A	Adenina
<i>agfA</i>	"Aggregative Fimbriae Gene"
AP	Água Peptonada
APT	Água Peptonada Tamponada
ASD	Ágar <i>Salmonella</i> Diferencial
AUS	Ausência
BHI	"Brain Heart Infusion" (Ágar Infusão Cérebro Coração)
BSA	Albumina de Soro Bovino
c	Número Máximo Aceitável de Unidades de Amostras com Contagens Entre os Limites "m" e "M".
C	Citosina
CBHAM	Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas
CBSY	Caldo Base Salmosyst para Pré-enriquecimento
CDC	"Center for Disease Control and Prevention" (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	"Clinical and Laboratory Standards Institute"
DNA	"Deoxyribonucleic Acid" (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
e	Margem de Erro Absoluto (Máximo); Precisão.
ECDC	"European Centre for Disease Prevention and Control" (Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doença).

EDTA	"Ethylenediamine Tetraacetic Acid" (Ácido Etilenodiamino Tetra Acético)
EFSA	"European Food Safety Authority" (Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos)
et al.	E Outros ( <i>et alli</i> ); E Colaboradores
etc.	E Outras Coisas Mais; E Os Restantes; E Outros ( <i>et coetera</i> )
G	Guanina
GL	Grau de Liberdade
H	Antígeno Flagelar
H <sub>2</sub> S	Sulfeto (Ácido Sulfídrico)
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Ágar Hektoen
<i>hin</i>	"Host Immune Response Gene"
<i>H-li</i>	"H Inversion Gene"; "Regulation of Flagellin Gene"
<i>iagAB</i>	"Insulin-Like Factor Androgenic Gland Gene"
IMViC	Indol; Vermelho de Metila; Voges-Proskauer; Citrato
IN	Instrução Normativa
<i>invA</i>	"Invasion Gene"; Gene de invasividade da <i>Salmonella</i> spp.
<i>IS200</i>	"Insertion Gene"
JR / Jr	Júnior
K	Antígeno Capsular
KCl	Cloreto de Potássio
KCN	Cianido de Potássio
KIA	Ágar Kliger
KOH	Hidróxido de Potássio
LIA	Ágar Lisina Ferro ("Lisine Iron Agar")
LPS	Lipopolissacarídeo(s)
m	Limite que, em Plano de Três Classes, Separa o Lote Aceitável do Produto ou Lote com Qualidade Intermediária Aceitável.
M	Limite que, em plano de Duas Classes, Separa o Produto Aceitável do Inaceitável.
M	Molar(es)
mg	Miligrama(s)
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
<i>mkfA</i>	"Mouse Killing Factor Gene"

ML	Ágar Manitol Lisina Cristal Violeta Verde Brilhante
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mM	Milimolar(es)
n	Número de Unidades a Serem Coletadas Aleatoriamente do Mesmo Lote e Analisadas Individualmente.
$n/N$	Amostra; Tamanho Mínimo da Amostra
nº	Número
NCCLS	"The National Committee for Clinical Laboratory Standards"
O	Antígeno Somático
<i>ompC</i>	"Outer Membrane Protein Gene"
OR	<i>Odds Ratio</i>
<i>oriC</i>	"Origin of Replication of Chromosome"
$p$	Estimativa Preliminar da Verdadeira Proporção; Frequência Esperada
p.	Página(s)
PCR	"Polimerase Chain Reaction" (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico (Potencial de Hidrogênio Iônico)
$q$	$100-p$
$r$	Coeficiente de Correlação de Pearson
$r^2$	Coeficiente de Correlação de Spearman
$R^2$	Coeficiente de Determinação
RA	Ágar Rambach
RDC	Resolução da Direção Colegiada
RJ	Rio de Janeiro
rpm	Rotações Por Minuto
RV	Caldo Rappaport-Vassiliadis
SC	Caldo Selenito Cistina
SDS	"Sodium Dodecyl Sulphate"
SIM	Sulfeto; Indol; Motilidade
spp.	Espécies
<i>spvR</i>	" <i>Salmonella</i> Plasmide Virulence Gene"
SS	Ágar <i>Salmonella-Shigella</i>
SSPT	Solução Salina Peptonada Tamponada
$t$	Teste de Student (teste $t$ )
T	Timina

TBE	Tris Borato (Ácido Bórico) EDTA
TE	Tris EDTA
™	“Trade Mark” (Marca Registrada)
Tris	Tris (Hidroximetil) Aminometano
TSA	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
TSI	Ágar Três Açúcares Ferro ou Ágar Tríplice Açúcar Ferro (“Tríplice Sugar Iron”)
TT	Caldo Tetrionato
UE	União Europeia
UFC	Unidade(s) Formadora(s) de Colônia(s)
UFF	Universidade Federal Fluminense
VB	Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
Vi	Antígeno Capsular
<i>viaB</i>	“Vi Antigen Gene”
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer
X	Concentração
X	Variável X; Variável Independente
X	Vezes (Número de Vezes do Aumento em Microscopia)
XLD	Ágar Xilose Lisina Desoxicolato
XLT4	Ágar Xilose Lisina Tergitol 4
Y	Variável Y; Variável Dependente
Z	Grau (Nível) de Confiança
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu\text{g}$	Micrograma(s)
$\mu\text{L}$	Microlitro(s)
$\mu\text{m}$	Micrômetro(s)
$\mu\text{M}$	Micromolar(es)
$\rho\text{mol}$	Pico Mol(es)
$\chi^2$	Qui-quadrado

## RESUMO

O hambúrguer é um alimento muito consumido, contudo, há uma grande possibilidade de haver algum tipo de contaminação da sua principal matéria prima, a carne. O gênero *Salmonella* representa um dos mais importantes grupos de bactérias patogênicas que podem estar presentes nos alimentos e um dos principais responsáveis por causar infecções alimentares. A detecção e identificação de bactérias do gênero *Salmonella* em alimentos é muito importante para o controle e a prevenção de surtos de infecção alimentar causados por estes microrganismos. Objetivou-se pesquisar e detectar *Salmonella* spp. em amostras de hambúrguer de carne bovina e de hambúrguer misto (carne bovina e carne de frango), comercializadas no município de Niterói-RJ, utilizando e comparando a metodologia microbiológica convencional, metodologia Salmosyst e o método de reação em cadeia da polimerase (PCR), além de comparar resultados obtidos em provas bioquímicas utilizando "Bactray" I e II e sorologia para a identificação da *Salmonella* spp.; realizar contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM) nas amostras de hambúrguer; verificar e correlacionar as temperaturas dos balcões frigoríficos de exposição e dos hambúrgueres no momento da coleta das amostras; verificar a existência de correlação entre os resultados da CBHAM com a frequência de contaminação por *Salmonella* spp. nas amostras; e identificar, através de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), os sorotipos de *Salmonella* spp. resistentes e sensíveis aos principais antimicrobianos utilizados em tratamentos clínicos. Foram analisadas 80 amostras de hambúrgueres, sendo 40 de carne bovina e 40 mistos através da microbiologia convencional, o método Salmosyst e a PCR para pesquisa de *Salmonella* spp., além da CBHAM e TSA. Realizou-se um estudo analítico observacional transversal. Os dados das variáveis do estudo foram apresentados e analisados através da frequência absoluta e estudo de frequência, teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), coeficiente de correlação de Spearman ( $r_2$ ), regressão linear e logística, teste de McNemar, testes diagnósticos, *Odds Ratio* (OR) e teste de Student (teste  $t$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico *BioEstat*<sup>®</sup>. Para a análise de similaridade utilizou-se o programa *WinClada*<sup>®</sup>, para a geração de um cladograma. Do total de amostras, 32 (40%) apresentaram-se contaminadas por *Salmonella* spp. O método da microbiologia convencional identificou 17 (21,25%), enquanto que o método Salmosyst identificou 11 (13,75%) e a PCR diagnosticou 18 (22,5%) amostras positivas. A CBHAM foi elevada em 43 (53,75%) das amostras. Do total de cepas (n=45) verificadas pelo TSA, 42 (93,33%) foram consideradas multirresistentes. Tanto os hambúrgueres bovinos quanto os mistos representam risco à saúde dos consumidores, sendo necessários uma melhor fiscalização e controle destes produtos por parte da Vigilância Sanitária, objetivando a redução da contaminação por *Salmonella* spp. e/ou quaisquer outros microrganismos patogênicos. Tornou-se evidente que a utilização de mais de um tipo de método de identificação, aumenta a probabilidade de detecção de *Salmonella* spp. em hambúrgueres. Além disso, os três testes foram eficientes, sendo úteis para o monitoramento e controle microbiológico na indústria de produção de alimentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hambúrguer. *Salmonella*. Microbiologia Convencional. Salmosyst. PCR.

## ABSTRACT

Although it is a widely consumed food item, the hamburger is at a high risk of some kind of contamination in its main raw material, meat. The *Salmonella* genus is one of the most important groups of pathogenic bacteria that may be present in foods, apart from being the main agent behind food poisoning. The detection and identification of *Salmonella* bacteria in foods is very important in the control and prevention of food poisoning outbreaks caused by these microorganisms. This study reports the detection of *Salmonella* spp. in beef hamburgers and hamburgers prepared with a mix of beef and chicken marketed in the city of Niteroi, state of Rio de Janeiro, Brazil, comparing the conventional microbiology method with the Salmosyst method and the Polymerase Chain Reaction method (PCR). Biochemical results obtained using Bactray I and II and serology were also compared. Aerobic mesophilic heterotrophic bacterial count (AMHBC) detected in hamburgers were carried out, and temperatures of freezers and counters where hamburger samples were collected were correlated. The correlation between AMHBC and *Salmonella* spp. prevalence in samples was assessed. Antibiotic Susceptibility Testing (AST) of resistant and susceptible *Salmonella* spp serotypes to antimicrobials most used in clinical treatments was carried out. Eighty hamburgers (40 beef samples and 40 beef and chicken mix samples) were analyzed using conventional microbiology, the Salmosyst method and PCR to detect *Salmonella* spp., as well as AMHBC and AST. A transversal analytical experimental design was used. The results were presented and analyzed based on absolute *Salmonella* spp. prevalence and prevalence investigation, chi-square test ( $\chi^2$ ), Pearson correlation coefficient ( $r$ ), Spearman correlation coefficient ( $r_2$ ), linear and logistic regression, McNemar test, diagnosis test, *Odds Ratio* (OR), and the Student's t test. All statistical analyses were carried out using the statistical software BioEstat™. Similarity analysis was conducted using the WinClada™ software, and a cladogram was generated. Of the total number of samples, 32 (40%) were contaminated with *Salmonella* spp. Bacterium was detected in 17 (21.25%) samples using conventional, in 11 (13.75%) using the Salmosyst method, in 18 (22.5%) using PCR. AMHBC afforded to detect the microorganism in 43 (53.75%) samples. Of the strains analyzed using AST (n=45), 42 (93.33%) were considered multiresistant. Both beef and beef and chicken hamburgers pose a health hazard, showing that more efficient inspection and control strategies should be adopted by health authorities aiming to lower contamination by *Salmonella* spp. and other pathogenic microorganisms. The results obtained reveal that using more than one detection method increases the chances of detecting *Salmonella* spp. in hamburgers. The detection methods used were proved efficient in microbiological monitoring and control in the food industry.

**KEY WORDS:** Hamburger. *Salmonella*. Standard Microbiology. Salmosyst. PCR.



## 1 INTRODUÇÃO

O hambúrguer é um alimento muito consumido pelos brasileiros, sendo o de carne bovina e o misto (carne bovina e carne de frango) os mais consumidos, principalmente pela praticidade do seu preparo e por ser um alimento com características sensoriais apreciadas pela maioria da população (ARISSETO, 2003; HAUTRIVE et al., 2008). Contudo, há uma grande possibilidade de haver algum tipo de contaminação da sua principal matéria prima, a carne, desde os insumos utilizados nas pastagens, tipo de criação (manejo), transporte do animal, abate (carcaça), manipulação, armazenamento, comercialização, até o seu preparo e consumo.

Na Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000 (BRASIL, 2000), consta que o hambúrguer é um produto cárneo industrializado, obtido da carne moída de animais de açougue, com adição ou não de tecido adiposo e outros ingredientes. Segundo Lima e Oliveira (2005) e Tavares e Serafini (2006), este produto é submetido a um processo de manipulação excessiva com problemático sistema de conservação, o que favorece a instalação e a veiculação de patógenos. Sendo assim, torna-se necessária a avaliação de sua qualidade higiênico-sanitária do ponto de vista microbiológico a fim de garantir que o consumo ocorra de forma segura e livre de contaminação.

O gênero *Salmonella* representa um dos mais importantes grupos de bactérias patogênicas que podem estar presentes nos alimentos, principalmente os de origem animal, e um dos principais responsáveis por causar infecções alimentares. Além disso, os surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) constituem um desafio às indústrias alimentícias e aos órgãos de Saúde Coletiva, sendo o hambúrguer, tanto de carne bovina quanto o misto, um dos alimentos mais frequentemente relacionado a estes surtos. As infecções alimentares, relacionadas com este produto, principalmente causadas por *Salmonella* spp., são denominadas salmoneloses.

As técnicas utilizadas, para a pesquisa de microrganismos, aplicadas na cadeia produtiva dos alimentos de origem animal, têm como objetivo principal diminuir os riscos de causar DTA aos consumidores destes alimentos, além de testar a qualidade destes produtos comercializados.

A detecção e identificação de bactérias do gênero *Salmonella* em alimentos e água é muito importante para o controle e a prevenção de surtos de

infecção alimentar causados por este microrganismo. Porém, a pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos através de métodos convencionais e/ou tradicionais utilizando meios de cultura clássicos, requer cerca de quatro a sete dias. Além disso, tem-se a possibilidade de serem obtidos resultados falso-positivos, devido principalmente a presença de outros microrganismos no alimento que competem diretamente com as células bacterianas de *Salmonella* spp.

O diagnóstico geralmente depende de isolar *Salmonella* spp. do paciente ou em alimentos. Este isolamento requer meios de cultura específicos, seletivos e diferenciais, sendo relativamente lentos para se chegar ao diagnóstico e/ou identificação do patógeno. Além disso, a pequena quantidade de *Salmonella* spp. encontrada nos alimentos representa um problema para a detecção da bactéria, conforme relatado por Tortora et al. (2012).

A análise microbiológica convencional ainda é a mais utilizada, além de ser o método oficialmente recomendado pela legislação brasileira, porém pode ser uma técnica demorada e limitante quando se processa um grande número de amostras, como geralmente ocorre nas indústrias de alimentos. Assim sendo, esta técnica, apesar de estar padronizada e de ser confiável apresenta-se pouco prática, principalmente para os serviços de inspeção, onde são necessários resultados rápidos e seguros, para a liberação ou não dos produtos de origem animal visando a comercialização e o consumo.

O isolamento e identificação de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos, em menor espaço de tempo e maior confiabilidade, tem se tornado cada vez mais importante, tanto que novas técnicas estão sempre sendo testadas e desenvolvidas na tentativa de facilitar e agilizar estes diagnósticos microbiológicos. Tais como os testes baseados na reação em cadeia da polimerase ("Polimerase Chain Reaction" – PCR).

Atualmente, as principais técnicas alternativas de diagnóstico e identificação de bactérias do gênero *Salmonella* são os testes baseados em grupos cromóforos e/ou fluoróforos (meios cromogênicos e/ou fluorogênicos) associados a diferentes tipos de substratos celulares e os testes baseados na PCR, sendo este um dos mais promissores e indicado para detectar, nas amostras de alimentos, material genético de células de *Salmonella* spp. que podem estar viáveis ou não e portanto serem cultiváveis ou não.

A PCR é considerada uma técnica sensível e específica para a detecção de vários microrganismos em matrizes alimentícias, sendo também empregada em análises de produtos de origem animal. É uma técnica na qual se detecta uma região única do genoma microbiano e que permite a replicação *in vitro* de sequências definidas do Ácido Desoxirribonucléico ("Deoxyribonucleic Acid" – DNA) do microrganismo pesquisado, isto é, apenas a região a ser amplificada pelo "primer" ou iniciador específico. Geralmente, quando comparada com os métodos microbiológicos convencionais, a PCR apresenta maior especificidade, segurança e rapidez. Porém, a principal limitação da técnica é a não diferenciação de células viáveis e não-viáveis, podendo assim apresentar resultados falsos-positivos, pois a detecção do material genético pode ter sido originado a partir de células mortas do microrganismo, não havendo assim risco de infecção alimentar aos consumidores.

Objetivou-se neste trabalho pesquisar e detectar a presença de *Salmonella* spp. em amostras de hambúrguer de carne bovina e de hambúrguer misto (carne bovina e carne de frango), comercializadas no município de Niterói-RJ, utilizando e comparando a metodologia microbiológica convencional, metodologia Salmosyst e o método de reação em cadeia da polimerase. E especificamente: (1) pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em hambúrgueres de carne bovina e hambúrgueres mistos, através das técnicas microbiológicas de isolamento bacteriano convencional; (2) pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em hambúrgueres de carne bovina e hambúrgueres mistos, através do método Salmosyst; (3) comparar o método de isolamento bacteriano convencional e o método Salmosyst; (4) pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em hambúrgueres de carne bovina e hambúrgueres mistos, através do método de reação em cadeia da polimerase; (5) comparar o método de isolamento bacteriano convencional e o método Salmosyst com o método da reação em cadeia da polimerase; (6) comparar os resultados obtidos em provas bioquímicas utilizando "Bactray" I e II com os resultados obtidos com a sorologia para a identificação de *Salmonella* spp.; (7) realizar contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas nas amostras de hambúrguer de carne bovina e hambúrguer misto; (8) verificar e correlacionar as temperaturas dos balcões frigoríficos de exposição e dos hambúrgueres no momento da coleta das amostras; (9) verificar a existência de correlação entre os resultados da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas com a frequência de

contaminação por *Salmonella* spp. nas amostras de hambúrguer de carne bovina e hambúrguer misto; e (10) identificar, através de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), os sorotipos de *Salmonella* spp. resistentes e sensíveis aos principais antimicrobianos utilizados em tratamentos clínicos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HAMBÚRGUER

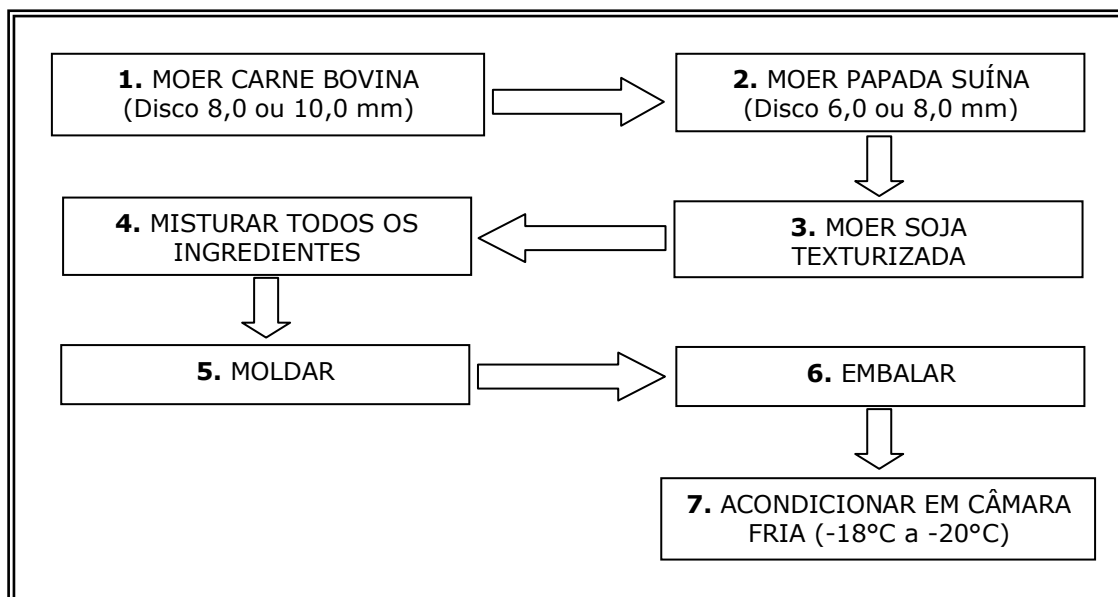
O hambúrguer teve origem na Alemanha, na cidade de Hamburgo, sendo degustado cru. Surgiu nas mesas de um restaurante em Washington em 1889, sendo plenamente comercializado nos Estados Unidos, a partir da década de 20, de tal forma que não se pensa no estilo de vida norte-americano sem este produto. A comercialização no Brasil teve início nos anos 50 e ficou conhecido depois que uma rede de "fast food" começou a produzi-lo em larga escala (NASCIMENTO et al., 2005).

De acordo com o descrito na Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000 (BRASIL, 2000), o hambúrguer é um produto cárneo industrializado, obtido da carne moída de animais de açougue, com adição ou não de tecido adiposo e outros ingredientes.

Segundo Guerreiro (2006) e Terra (1998), a formulação do hambúrguer possui como matéria-prima, carne bovina magra; papada e proteína texturizada de soja fina, hidratada. Além disso, apresenta como ingredientes, Cloreto de Sódio; Eritorbato de Sódio; Pimenta Branca Moída; Glutamato Monossódico; Alho em Pó e Aroma de Cebola. No processamento as carnes são moídas em disco de 8,0 mm ou 10,0 mm e, em misturadeira, incorporam-se os ingredientes. Após conveniente mistura, transfere-se a massa à máquina dosificadora-formadora; e depois de obtidos os hambúrgueres, estes são imediatamente congelados a uma temperatura entre -18°C e -20°C (**FIGURA 1**).

Alguns defeitos podem ocorrer, como a falta de liga da massa, que acontece quando, no momento da inclusão, a proteína texturizada de soja não está completamente hidratada ou quando a mistura dos ingredientes com as carnes não foi adequadamente conduzida (TERRA, 1998).

Além disso, durante a produção do hambúrguer, tanto em estabelecimentos industriais e varejistas quanto na fabricação caseira, pode ocorrer contaminação resultante da adoção de práticas inadequadas de higiene ou após adição de condimentos ou outros ingredientes contaminados (RIVAS et al., 2003; TAVARES; SERAFINI, 2006).



**FIGURA 1.** Esquema do processamento do hambúrguer.  
 FONTE: GUERREIRO (2006); TERRA (1998).

## 2.2 PADRÃO MICROBIOLÓGICO DO HAMBÚRGUER

*Salmonella* spp. possui fundamental importância em saúde pública, pelo fato de ser patogênica ao ser humano e de se constituir num parâmetro microbiológico de reconhecimento mundial para a detecção de contaminantes alimentares (VON RÜCKERT et al., 2006).

Em conformidade com a Instrução Normativa (IN) nº 20 (BRASIL, 2000), que regula a identidade e qualidade do hambúrguer, aplica-se a legislação vigente em relação aos critérios microbiológicos. Sendo assim, os limites de tolerância máxima e padrões microbiológicos para hambúrgueres, são estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001), descritos na **TABELA 1**.

Na legislação brasileira (BRASIL, 2001) não consta limites de tolerância para a Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) em placas, contagem de coliformes a 35°C e contagem total de fungos filamentosos e leveduras para hambúrgueres. Porém, tem sido observado que a presença de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (BHAM) em contagens acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g em carne moída fresca compromete o produto em relação à sua qualidade higiênico-sanitária (MORTON, 2001; SILVA et al., 2007).

**TABELA 1.** Tolerância máxima e padrões microbiológicos, estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para hambúrgueres.

MICROORGANISMOS	Tolerância para amostra indicativa	Tolerância para amostra representativa			
		n	c	m	M
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g	5,0x10 <sup>3</sup>	5	2	10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>
<b>Salmonella spp./25 g</b>	<b>AUS</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>AUS</b>	<b>-</b>
Coliformes a 45°C/g	5,0x10 <sup>3</sup>	5	3	5,0x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>
<i>Clostridium</i> sulfito redutor a 46°C/g	3,0x10 <sup>3</sup>	5	2	5,0x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>

**n** = número de unidades a serem coletadas aleatoriamente do mesmo lote e analisadas individualmente.

**c** = número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites "m" e "M".

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

**M** = limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável.

Em plano de três classes, **M** separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de **M** são inaceitáveis.

**AUS** = ausência em 25 g.

FONTE: BRASIL (2001).

## 2.3 *Salmonella* spp.

### 2.3.1 Classificação

*Salmonella* é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae. Contém mais de 2.600 sorotipos (também denominados como variedades sorológicas ou sorovares ou linhagens) diferentes. Estes sorotipos são diferenciáveis pelos seus antígenos O, H e Vi (ou K). Os sorotipos são divididos em sorogrupos de acordo com os fatores antigênicos comuns (FORSYTHE, 2002; GUIBOURDENCHE et al., 2010; VELGE et al., 2012). Segundo Levinson e Jawetz (2006), estes antígenos são importantes para fins taxonômicos e epidemiológicos.

A taxonomia é baseada na composição de seus antígenos de superfície, que são os antígenos somáticos (O), os flagelares (H) e os capsulares (Vi). Os antígenos O são designados por números arábicos (1, 2, 4, etc.). Os antígenos H são designados por letras minúsculas e por números arábicos. Como o número de antígenos H é maior do que as letras do alfabeto, a última letra recebe números subscrito (z<sub>1</sub>, z<sub>2</sub>, z<sub>3</sub>, etc.). Só existe um tipo imunológico de antígeno Vi, encontrado somente em *Salmonella* Typhi, *S. Dublin* e *S. Hirschfeldii* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Forsythe (2002) descreveu que alguns sorotipos foram nomeados inicialmente conforme o local onde foram isolados inicialmente, como *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Heidelberg. Outros foram nomeados após a enfermidade e o animal afetado, tais como *Salmonella* Typhimurium, que causa a febre tifóide em camundongos. As bactérias *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi são, normalmente, septicêmicas e produzem febre tifóide ou doenças semelhantes em humanos. Porém, Pelczar Jr. et al. (2005), afirmaram que há uma única espécie no gênero, *Salmonella enterica*, mas existem mais de 2.600 sorotipos, todos patogênicos para os humanos e alguns animais. Embora os sorotipos pertençam a uma única espécie, os seus nomes são tradicionalmente escritos como se fossem de diferentes espécies. Cada sorotipo é caracterizado por uma combinação de antígenos O e H.

Tortora et al. (2012), citaram que a nomenclatura do gênero *Salmonella* é incomum. Ao invés de múltiplas espécies, os membros do gênero *Salmonella* podem ser considerados como uma única espécie, *Salmonella enterica*, sendo esta espécie dividida em mais de 2.600 sorotipos (variedades sorológicas). Um sorotipo como a *Salmonella typhimurium* não é uma espécie, sendo a forma mais correta de descrever, *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium. No "Center for Disease Control and Prevention" (Centro de Controle e Prevenção de Doenças – CDC) foi convencionado o uso do nome completo na primeira vez que a bactéria for mencionada e depois a abreviatura, ficando *Salmonella* Typhimurium.

Guibourdenche et al. (2010); Grimont e Weill (2007) e Jay (2005) descreveram que algumas mudanças ocorreram na taxonomia da *Salmonella*. Embora se considerem os 2.600 sorotipos como se cada um fosse uma espécie, todas as salmonelas foram agrupadas baseadas em estudos moleculares em apenas duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (**TABELA 2**), e mais de 2.000 sorotipos foram divididos em cinco subespécies ou grupos, muitos dos quais classificadas como *S. enterica*. Os maiores grupos correspondem às seguintes subespécies: Grupo I (*Salmonella enterica* subespécie Enterica); Grupo II (*Salmonella enterica* subespécie Salamae); Grupo IIIa (*Salmonella enterica* subespécie Arizonae); Grupo IIIb (*Salmonella enterica* subespécie Diarizonae); Grupo IV (*Salmonella enterica* subespécie Houtenae); e Grupo VI (*Salmonella enterica* subespécie Indica). Os organismos pertencentes ao Grupo V foram elevados a espécie sendo denominada *Salmonella bongori*. Assim a forma anterior de nomenclatura, que tratava sorotipos de *Salmonella* como espécies,



não é mais usada, passando a usar a seguinte nomenclatura como exemplo: *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium ou *Salmonella* Typhimurium, observando que o sorotipo é escrito com a primeira letra maiúscula e não em itálico.

**TABELA 2.** Características dos grupos filogenéticos do gênero *Salmonella*.

ESPÉCIES	SUBESPÉCIES	NÚMERO DE SOROTIPOS	HOSPEDEIROS
<i>Salmonella enterica</i>	I (Enterica)	1.547	Animais de sangue quente
	II (Salamae)	513	
	IIIb (Diarizonae)	341	
	IIIa (Arizonae)	100	Animais de sangue frio
	IV (Houtenae)	73	
	VI (Indica)	13	
<i>Salmonella bongori</i>	V (Bongori)	23	
<b>TOTAL</b>		<b>2.610</b>	

FONTE: GUIBOURDENCHE et al. (2010); GRIMONT; WEILL (2007); TRABULSI; ALTERTHUM (2008).

Existem atualmente mais de 2.600 sorotipos de *Salmonella*, entre os quais 1.547 pertencem a *S. enterica* subespécie I. Dentro desta subespécie, estão contidos cerca de 99,5% dos sorotipos mais comumente isolados. Os sorotipos pertencentes à subespécie *S. enterica* I são designados por um nome geralmente relacionado ao local geográfico onde, foi pela primeira vez isolado, não sendo mais o termo específico, escrito em itálico e sua primeira letra é maiúscula, tais como: *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Enteritidis, etc. Os sorotipos das outras subespécies de *S. enterica* e aqueles de *S. bongori* são designados apenas por suas fórmulas antigênicas (GUIBOURDENCHE et al., 2010; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; VELGE et al., 2012).

Esta divisão em espécies e subespécies apresenta pouca importância prática em medicina e epidemiologia. Rotineiramente é utilizado um esquema de identificação denominado de Kaufmann e White, que divide salmonelas em sorotipos, tendo por base a composição antigênica das salmonelas com relação aos seus antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) (**TABELA 3**).

**TABELA 3.** Esquema abreviado de Kaufmann e White para a classificação de *Salmonella* spp. contendo os sorotipos de maior significado clínico.

SOROTIPO	GRUPO	FÓRMULA ANTIGÊNICA		
		ANTÍGENO O	ANTÍGENO H	
			FASE 1	FASE 2
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	O:2 (A)	1, 2, 12	a	[1, 5]*
<i>Salmonella</i> Paratyphi B		1, 4, [5], 12	b	1, 2
<i>Salmonella</i> Schottmuelleri		1, 4, [5], 12	b	1, 2
<i>Salmonella</i> Typhimurium	O:4 (B)	1, 4, [5], 12	i	1, 2
<i>Salmonella</i> Agona		1, 4, 12	f, g, s	[1, 2]
<i>Salmonella</i> Derby		1, 4, [5], 12	f, g	[1, 2]
<i>Salmonella</i> Saintpaul		1, 4, [5], 12	e, h	1, 2
<i>Salmonella</i> Choleraesuis		6, 7	c	1, 5
<i>Salmonella</i> Oranienburg		6, 7, 14	m, t	[z <sub>57</sub> ]
<i>Salmonella</i> Infantis	O:7 (C <sub>1</sub> )	6, 7, 14	r	1, 5
<i>Salmonella</i> Hirschfeldii		6, 7, [Vi]	c	1, 5
<i>Salmonella</i> Montevideo		6, 7	g, m, s, [p]	[1, 2, 7]
<i>Salmonella</i> Newport	O:8 (C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> )	6, 8, 20	e, h	1, 2
<i>Salmonella</i> Typhi		9, 12, [Vi]	d	—
<i>Salmonella</i> Enteritidis	O:9 (D <sub>1</sub> )	1, 9, 12	g, m	—
<i>Salmonella</i> Gallinarum		1, 9, 12	—	—
<i>Salmonella</i> Anatum	O:3, 10 (E <sub>1</sub> )	3, 10, [15, 34]	e, h	1, 6

\* [ ] pode ou não ocorrer.

FONTE: JAY (2005); TRABULSI; ALTERTHUM (2008).

Atualmente existem diferentes métodos para a taxonomia das salmonelas, todos aceitos. Na classificação feita por Edwards e Edwin o gênero é dividido em três espécies: *Salmonella typhi*; *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella enteritidis*. Nesse esquema existe um sorotipo em cada uma das primeiras duas espécies e 1.500 sorotipos para a terceira espécie. *Salmonella enteritidis* abriga todas as demais salmonelas, que são consideradas sorotipos de uma mesma espécie. Como exemplo: *Salmonella enteritidis* sorotipo Typhimurium. Na classificação de Kaufmann e White atribuem-se nomes para cada sorotipo das diferentes espécies utilizando o nome da cidade em que os microrganismos foram isolados. Desse modo, *Salmonella dublin* seria *Salmonella enteritidis* sorotipo Dublin, conforme Edwards e Ewing. No esquema de Le Minor, por sua vez, considera-se que o gênero *Salmonella* é formado por apenas uma espécie (*Salmonella enterica*), com sete subespécies (*choleraesuis*, *salamae*,

*arizonae*, *diarizonae*, *housetanae*, *bongori* e *indica*). A subespécie *choleraesuis* contém todos os sorotipos da classificação de Edwards e Ewing. Assim, um exemplo de grafia seria: *Salmonella enterica* subespécie *choleraesuis* sorotipo Typhimurium, sendo observado que as salmonelas são grafadas de forma simplificada, citando-se apenas o gênero e o sorotipo (*Salmonella* Typhimurium). Atualmente propõe-se que a subespécie *bongori* seja também considerada uma espécie de *Salmonella*. Outro método para nomear salmonelas é baseado na similaridade determinada por análises de hibridização de DNA. Nessa classificação, *Salmonella typhi* não é uma espécie distinta, mas é classificada como *Salmonella enterica*, subespécie Typhi (FRANCO; LANDGRAF, 2008; LEVINSON; JAWETZ, 2006).

Jawetz et al. (2005), explicaram que os nomes dos membros do gênero *Salmonella* foram dados, e ainda são utilizados, como se fossem gênero e espécie, porém seu uso é incorreto. Nos estudos de hibridização do DNA têm-se observado que existem sete grupos evolutivos, sendo que quase todos os sorotipos de salmonelas que infectam os seres humanos estão incluídos no grupo do DNA I e que raras infecções ocorrem com os grupos DNA IIIa e DNA IIIb. Sendo assim, o nome de uma única espécie foi sugerido, *Salmonella choleraesuis*, mas isto poderia fazer mais confusão já que existe um estereotipo *choleraesuis*. Consequentemente o nome *Salmonella enterica* foi sugerido e os microrganismos no grupo de hibridização do DNA I são *Salmonella enterica* subespécie *enterica*. Os microrganismos nos outros grupos possuem outros nomes de subespécies. O nome da espécie *Salmonella enterica* tornou-se de uso internacional, porém ainda aguarda aceitação formal. A nomenclatura aceita para a classificação fica a seguinte: *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, sorotipo Typhimurium, que pode ser reduzido a *Salmonella* Typhimurium com o nome do gênero em itálico e o nome do sorotipo em tipo romano.

Para efeito de normatização será adotado, neste trabalho, o esquema de nomenclatura simplificada, citando apenas o gênero e o sorotipo (*Salmonella* Typhimurium), salvo devidas exceções.

### 2.3.2 Características

As bactérias do gênero *Salmonella*, foram assim denominadas para homenagearem seu descobridor **Daniel Elmer Salmon**. Têm forma de

bastonetes (bacilos) curtos (1,0  $\mu\text{m}$  a 2,0  $\mu\text{m}$ ), são parasitas intracelulares, Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos. Habitam naturalmente o trato intestinal dos seres humanos e outros animais. A maioria é móvel, com flagelos peritríquios, exceto *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* que não possuem flagelos. Fermentam glicose, produzindo ácido e gás, mas a grande maioria são incapazes de metabolizarem a lactose e a sacarose, mas produzem  $\text{H}_2\text{S}$  e utilizam o citrato como única fonte de carbono, características utilizadas em laboratório para identificação. Não liquefazem a gelatina e não crescem em presença de cianido de potássio (KCN). Não possuem urease, nem desaminases, porém são lisina-descarboxilase positivas. Nos testes bioquímicos do IMViC (Indol; Vermelho de Metila; Voges-Proskauer; Citrato) comportam-se resultando a seguinte leitura (- + - +), respectivamente. A temperatura ótima de crescimento é de aproximadamente 38°C e a temperatura mínima para o crescimento é de cerca de 5°C. São termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C, por 15 a 20 minutos. Crescem melhor em alimentos não ácidos ou de baixa acidez, sendo o intervalo de pH entre 4,5 e 9,0 e a atividade de água ( $a_w$ ) mínima variando, conforme o alimento, de 0,93 a 0,95. Podem sobreviver durante semanas na água destilada e em águas puras não poluídas podem sobreviver por períodos ainda mais longo, principalmente pela falta de competição biológica. Não resistem à exposição direta aos raios solares por mais de oito horas, mas resistem por 122 horas à luz indireta (BIER, 1985; FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2008; GUIBOURDENCHE et al., 2010; HOLT et al., 1994; KAYSER et al., 2005; LEVINSON; JAWETZ, 2006; PARDI et al., 1995; PELCZAR JR et al., 2005; ROGERS, 2011; VELGE et al., 2012; SHETTY et al., 2009; TORTORA et al., 2012).

### 2.3.3 Estrutura celular

A célula bacteriana de *Salmonella* spp. possui uma estrutura complexa de lipopolissacarídeos (LPS), a qual é denominada antígeno O. O número de repetições de unidades e a composição de açúcar variam consideravelmente no LPS de *Salmonella* ssp. e são de vital importância no que se refere aos estudos epidemiológicos. Os açúcares são antigênicos e, portanto, podem ser utilizados imunologicamente para identificar a *Salmonella* spp. isolada. O sorotipo isolado auxilia os estudos epidemiológicos traçando o vetor das infecções causadas. As

caracterizações posteriores são necessárias para estudos epidemiológicos e incluem perfis bioquímicos e fagotipagem (FORSYTHE, 2002).

Os antígenos O são polissacarídeos termoestáveis localizados na superfície da parede celular bacteriana, sendo designados por números de 1 a 67. Os antígenos H são proteínas flagelares que são facilmente destruídos pelo calor. Existem duas categorias de antígenos H, denominadas por Fase 1 e Fase 2. Cada antígeno da Fase 1 ocorre somente em poucos sorotipos e é designado por uma letra de *a* a *z*. Os antígenos da Fase 2 são largamente distribuídos entre os sorotipos e são geralmente designados por números (PELCZAR JR et al., 2005). Levinson e Jawetz (2006), descreveram que os antígenos Vi são polissacarídeos capsulares e têm ação antifagocíticos sendo um importante fator de virulência para *Salmonella* Typhi. Estes antígenos Vi também são utilizados para a tipagem de *Salmonella* Typhi no laboratório clínico.

O antígeno O localiza-se na fração lipopolissacarídica da membrana externa. Essa fração é constituída de um lipídeo denominado lipídeo A, ligado a uma porção polissacarídica (cerne), de onde partem cadeias monossacarídicas. O lipídeo A é responsável pelo efeito tóxico que o LPS apresenta (endotoxina). A porção intermediária (cerne) é composta por polissacarídeos e por cetodeoxioctanato. As cadeias laterais monossacarídicas são compostas de seqüências de açúcares que se repetem duas a seis vezes numa mesma cadeia. A porção polissacarídica do cerne é a mesma em todas as salmonelas, mas as cadeias laterais são bastante específicas para os diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. Determinando o antígeno O de cada sorotipo. Algumas células de *Salmonella* spp. não têm antígeno O, e quando cultivadas em meio sólido formam colônias de aspecto irregular (rugosas). Os antígenos H são de natureza protéica, e também são espécie-específicos. Podem apresentar-se sob duas formas genotipicamente diferentes na mesma célula. Esse fenômeno denomina-se variação de fase, compreendendo as Fases 1 e 2. Uma cultura de *Salmonella* spp. pode, em uma mesma cultura, apresentar células com antígenos H na Fase 1 e na Fase 2 simultaneamente, independentemente do tipo de antígeno H da célula que originou essa cultura. Algumas células de *Salmonella* spp. não apresentam flagelos e são portanto imóveis, enquanto outras podem ter flagelos em uma fase só (monofásico). Porém, a maioria das salmonelas é bifásica, apresentando flagelos de Fase 1 e de Fase 2 simultaneamente (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

## 2.4 DOENÇAS CAUSADAS POR SALMONELAS – SALMONELOSES

*Salmonella* spp. é uma das principais bactérias transmitida por alimentos sendo responsável pela ocorrência de doenças que ocasionam perdas econômicas em todo o mundo (GIOMBELLI; SILVA, 2002).

Os agentes etiológicos das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são grandes problemas de saúde coletiva em qualquer parte do mundo, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil. Geralmente estes agentes etiológicos causam doenças que resultam em frequente abstinência ao trabalho e à escola. A severidade varia muito e as fontes mais comuns de infecções são hambúrgueres, "fast foods" e alimentos de "self-services", onde os alimentos ficam mais vulneráveis a uma série de riscos de contaminação por microrganismos, o que pode ser atribuído ao preparo rápido, manipulação e procedimentos inadequados durante o processamento e exposição (LIMA; OLIVEIRA, 2005).

O consumo de alimento contaminado com patógenos microbianos (bactérias, fungos, parasitas, vírus, e suas toxinas) causa cerca de 76 milhões de toxinfecções, 325.000 hospitalizações, e 5.000 mortes todos os anos nos Estados Unidos. A maioria dos casos de toxinfecções alimentares é classificada como agudo. Estes casos são geralmente autolimitantes e de curta duração, embora podendo variar de suave a severo. Os problemas gastrintestinais e vômitos são sintomas agudos comuns de muitas doenças alimentares. Os indivíduos que enfrentam riscos relativamente mais elevados da toxinfecção alimentar e complicações associadas, tais como a falha de rim, incluem o muito jovem, o idoso, e o imunocomprometido como aqueles com AIDS e câncer (BUZBY, 2001; 2002).

As crianças têm o risco mais elevado de contraírem a salmonelose, principalmente as crianças menores de dez anos de idade que são o segundo grupo de risco mais elevado. As crianças, assim como imunocomprometidos e as pessoas idosas, igualmente enfrentam um risco relativamente mais elevado de morte devido à do que outras categorias demográficas (BUZBY, 2001; 2002).

*Salmonella* spp. são bactérias patogênicas importantes para a indústria alimentar sendo um dos microrganismos mais significativos causadores de infecção alimentar (SIQUEIRA et al., 2003), sendo uma das principais bactérias transmitida por alimentos responsável pela ocorrência de doenças que ocasionam

perdas econômicas em todo o mundo (GIOMBELLI; SILVA, 2002). São patógenos intracelulares que invadem a membrana mucosa do trato intestinal, e são transmitidas de forma fecal-oral aos seres humanos principalmente através da água, da carne, dos ovos e dos produtos das aves domésticas contaminados. A infecção por *Salmonella* spp. é uma doença gastrintestinal, sendo a mais frequente transmitida dos outros animais aos seres humanos (D'AOUST, 1991; FERRETTI et al., 2001; KWANG et al., 1996; RIYAZ-UL-HASSAN et al., 2004). Van Pouke (1990) afirmou que a infecção por *Salmonella* spp. é resultado da ingestão do alimento ou da água que contendo números suficientes destas bactérias que alcançam e invadem o intestino delgado, sendo que os principais sintomas clínicos incluem a gastroenterite aguda, bacteremia, com ou sem infecção extraintestinal, febre, e até um estado assintomático do portador.

Os membros do gênero *Salmonella* são causas principais de infecção alimentar no mundo inteiro (BENNETT et al., 1998; FLUIT et al., 1993). Segundo Schrank et al. (2001), os sorotipos de *Salmonella enterica* são os agentes bacterianos primários responsáveis pelas manifestações de doença gastrintestinal humana. Entre os diferentes sorotipos, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis são de importância clínica particular.

De acordo com Painter et al. (2013), que os sorotipos mais frequentemente isolados de humanos são *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Javiana, *Salmonella* Newport e *Salmonella* Typhimurium.

Entretanto, segundo a Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (EFSA – “European Food Safety Authority”), nos países da União Europeia (UE), *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são os sorotipos mais frequentemente associados às salmoneloses humanas (EFSA, 2013).

A salmonelose é uma das mais antigas e a mais comum síndrome de infecção alimentar, com uma taxa de mortalidade total de até 0,2% (GOODING; CHOUDARY, 1999). É uma doença de origem alimentar que provoca a maioria dos surtos que afetam centenas de pessoas, embora possa ser causada por qualquer um dos mais de 2.600 sorotipos que existem sendo uma infecção de importância para a saúde pública devido ao impacto sócio-econômico que ocasiona tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos (GUTIÉRREZ-COGCO et al., 2000).

Franco e Landgraf (2008) descreveram que estas doenças causadas por *Salmonella* spp. podem ser subdivididas em três diferentes grupos: a febre

tifóide, causada por *Salmonella* Typhi, as febres entéricas, causadas por *Salmonella* Paratyphi e as enterocolites ou salmoneloses (infecções alimentares), causadas pelas demais salmonelas.

#### **2.4.1 Febre tifóide e febres entéricas**

A febre tifóide só ocorre ao ser humano sendo transmitida por água e alimentos contaminados por fezes humanas. Tem um período de incubação que varia de sete a 21 dias. Os sintomas são classificados como muito graves, tais como, septicemia, febre alta, diarreia e vômitos. Durando de uma a oito semanas. A infecção tem início com a penetração das bactérias nas células epiteliais intestinais, invasão na lâmina própria e entrada na corrente linfática. As salmonelas são fagocitadas pelos macrófagos e no interior destes se multiplicam, causando a destruição dos macrófagos, sendo liberadas inúmeras bactérias na circulação sanguínea e linfática, através dos quais poderão atingir diversos órgãos, como fígado, baço e vesícula biliar, até estabelecer uma infecção sistêmica (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SIQUEIRA, 1995).

As febres entéricas se assemelham à febre tifóide, porém os sintomas são mais brandos. Apresentam um período de incubação que varia de seis a 48 horas. Também são causadas por consumo de água e alimentos contaminados por fezes. Ocorrem septicemia, febre, vômitos e diarreia e a duração é no máximo de três semanas (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SIQUEIRA, 1995).

#### **2.4.2 Patogenia e patologia das enterocolites por salmonelas**

As enterocolites causadas por *Salmonella* spp. caracterizam-se por sintomas que incluem diarreia, febre, dores abdominais e vômitos. Os sintomas aparecem, em média, de 12 a 36 horas após ingestão do alimento contaminado pelo microrganismo, com persistência dos sintomas durando entre um a quatro dias. As infecções começam na mucosa do intestino delgado e do cólon. As salmonelas atravessam a camada epitelial intestinal, alcançam a lâmina própria e se multiplicam. As salmonelas são fagocitadas pelos monócitos e macrófagos, resultando em uma resposta inflamatória, devido a hiperatividade do sistema retículo endotelial. Raramente se observa septicemia ou infecção sistêmica, pois a infecção fica restrita à mucosa intestinal. A resposta inflamatória também está



relacionada com a liberação de prostaglandinas, estimuladoras de adenilciclase, que resulta em um aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando diarréia aquosa. De modo geral, as enterocolites por *Salmonella* spp. não necessitam de tratamento com antimicrobianos. Em alguns casos, a antimicrobianoterapia agrava o quadro clínico e pode prolongar o estado de portador. Nas crianças pequenas e nos recém-nascidos, a salmonelose pode ser bastante grave, pois a *Salmonella* spp. pode atingir a corrente circulatória e provocar lesões em outros órgãos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os seres humanos são infectados por salmonelas devido ao consumo de água e alimentos contaminados, sendo que os alimentos mais envolvidos são cremes doces, carne moída, linguças, carne de aves, carne assada e ovos. Cerca de oito a 48 horas, podendo variar entre cinco e 72 horas, após a ingestão do alimento contaminado com salmonelas, os pacientes apresentam uma súbita dor abdominal acompanhada por diarréia aquosa, podendo ocasionalmente conter muco ou sangue. Náuseas, vômitos, cólicas, cefalgias (cefaleia), calafrios e febre de 38°C a 40°C são comuns. Estes sintomas provavelmente são causados por endotoxinas das salmonelas ou pela produção de enterotoxinas. A fadiga e outros efeitos danosos da infecção devem-se principalmente à desidratação e à toxemia. Os sintomas da salmonelose geralmente desaparecem em dois a cinco dias, no entanto a enterocolite por *Salmonella* spp. pode ser fatal em crianças ou idosos. A taxa de mortalidade é muito baixa, porém é alta em lactentes e indivíduos idosos. Normalmente a recuperação ocorre em alguns dias, mas muitos pacientes continuam a disseminar as bactérias em suas fezes por até seis meses. O antimicrobiano não é útil no tratamento que consiste praticamente de terapia de reidratação oral (PARDI et al., 1995; PELCZAR JR et al., 2005; TORTORA et al., 2012).

Os sintomas são geralmente acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, nervosismo e sonolência, os quais persistem por dois a três dias. A taxa de mortalidade, em média, é de 4,1%, sendo de 5,8% durante o primeiro ano de vida e 2% entre o primeiro e os 50 anos (JAY, 2005).

Forsythe (2002) descreveu que a dose infectante varia de acordo com a linhagem da *Salmonella* spp., podendo variar de 20 até  $10^6$  células bacterianas. Contudo, Jay (2005) afirmou que concentrações em torno de  $10^7$  a  $10^9$  células por grama são necessárias para que ocorra uma infecção.

A enfermidade é causada pela passagem no lúmen e penetração de células bacterianas no epitélio e tecido subepitelial dos intestinos delgado e grosso, onde ocorre a multiplicação. Em seguida a bactéria invade o íleo e o cólon penetrando por e entre as células da mucosa, propiciando uma transmigração de neutrófilos para o lúmen intestinal, característico de uma resposta inflamatória e diarreia autolimitante. A resposta leucocítica polimorfonuclear limita a infecção aos intestinos e aos nódulos linfáticos mesentéricos adjacentes. A doença geralmente é autolimitante e persiste durante dois a sete dias, sendo que a pessoa infectada excretará grandes quantidades da bactéria pelas fezes durante o período da doença. O número de salmonelas nas fezes decresce com o tempo, mas em portadores assintomáticos este número continua por até três meses (FORSYTHE, 2002; LEVINSON; JAWETZ, 2006; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Normalmente a doença dura poucos dias, pois é autolimitada, causando diarreia não hemorrágica e não requerendo cuidados médicos, exceto em crianças e idosos. Sempre se torna importante o tratamento de reidratação. O tratamento com antimicrobianos não diminui a doença nem reduz os sintomas, podendo até prolongar a excreção dos microrganismos, aumentar a frequência do estado de portador e selecionar mutantes resistentes aos antimicrobianos. Os agentes antimicrobianos são indicados apenas em recém-nascidos ou em indivíduos com doenças crônicas que correm risco de septicemia e de abscessos disseminados. Raramente o tratamento antimicrobiano é aconselhado, pois prolonga o período de excreção da bactéria além de determinar a emergência de amostras multirresistentes. Pacientes idosos são mais sensíveis à doença e tendem a apresentar infecções mais severas (LEVINSON; JAWETZ, 2006; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Há lesões inflamatórias nos intestinos delgado e grosso. A bacteremia é rara (2% a 4%), exceto em indivíduos imunodeficientes. Em geral, as hemoculturas são negativas, porém as coproculturas são positivas para salmonelas e podem permanecer por várias semanas após a recuperação clínica (JAWETZ et al., 2005).

### 2.4.3 Epidemiologia

Salmonelas são muito difundidas, podendo estar presentes no solo, no ar, na água, em águas residuais, nos seres humanos, nos outros animais, nos alimentos, nas fezes, nos equipamentos. Entretanto, o seu habitat natural é o trato intestinal dos seres humanos e dos outros animais (SIQUEIRA, 1995). Para Von Rückert et al. (2006), *Salmonella* spp. possui fundamental importância em saúde pública, pelo fato de ser patogênica ao ser humano e de se constituir num parâmetro microbiológico de reconhecimento mundial para a detecção de contaminantes alimentares.

As salmonelas são amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato intestinal de humanos e de outros animais o principal reservatório natural. Entre os animais, as aves domésticas são os reservatórios mais importantes. Suínos, bovinos, equinos e animais silvestres (roedores, anfíbios e répteis) também apresentam salmonelas. Os animais domésticos (cães, gatos, pássaros, etc.) podem ser portadores, representando grande risco, principalmente às crianças. As aves têm um papel importante, pois podem ser portadoras assintomáticas, excretando continuamente salmonelas pelas fezes. Animais nessas condições podem causar contaminações cruzadas de grande importância nos abatedouros de aves (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Segundo Kwang et al. (1996) e Von Rückert et al. (2006), a incidência de salmoneloses continua aumentando significativamente em todo o mundo. Geralmente, os humanos são infectados por *Salmonella* spp. através de água e alimentos contaminados, sendo as aves e os bovinos indicados como as principais origens dessa bactéria.

Jay (2005), descreveu que o habitat primário de *Salmonella* spp. é o trato intestinal de animais, como pássaros, répteis, animais de granja, humanos e ocasionalmente insetos. Como forma intestinal, os microrganismos são excretados nas fezes, das quais podem ser transmitidos por insetos e por outros organismos vivos para um grande número de localidades. Dessa forma, *Salmonella* spp. pode também ser encontrada na água, especialmente em águas poluídas. Quando a água poluída e alimentos que foram contaminados são consumidos por pessoas e outros animais, esses microrganismos são novamente excretados no material fecal, continuando o ciclo.

Segundo Franco e Landgraf (2008), *Salmonella* spp. é um dos microrganismos mais frequentemente envolvidos em casos e surtos de doenças

de origem alimentar em diversos países. No Brasil, os quatro sorotipos mais frequentemente encontrados em humanos, em alimentos e amostras ambientais são: *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Anatum e *Salmonella* Oranienburg.

Em 19 surtos, notificados no período de julho de 1993 a julho de 1997 na região Noroeste do Estado de São Paulo, onde foram isoladas cepas de *Salmonella* spp. Peresi et al. (1998) verificaram a ocorrência de um total de 906 casos, com 295 hospitalizações, sendo que os principais sintomas apresentados foram diarreia (99,2%), vômito (65,7%), febre (88,5%) e dor abdominal (74,6%). Além disso, também foi verificado que a *Salmonella* spp. foi veiculada por alimentos contendo ovos, sendo associado ao consumo de alimentos à base de ovos crus em todos os surtos e dois surtos relacionados à cocção insuficiente de ovos inteiros e de alimento (nhoque) . Apenas um dos surtos foi associado ao consumo de carne de aves.

Significativos aumento no número de surtos por *Salmonella* Enteritidis foram observados na Grande São Paulo desde 1994. Foram relatados, no período de outubro de 1994 a junho de 1997, 18 surtos de DVA causadas por *Samonella* spp. envolvendo 23 alimentos, sendo que em 13 (72,2%) surtos foram identificados *Salmonella* Enteritidis. Os alimentos envolvidos foram predominantemente de origem animal, em especial ovos e seus derivados (JAKABI et al., 1999).

Nadvorny et al. (2004) verificaram que de 99 surtos de DVA ocorridos no Rio Grande do Sul, em 2000, 74 (74,7%) foram ocasionados por *Salmonella* spp., sendo que os alimentos preparados com ovos estiveram envolvidos em 72,2% dos surtos e a carne de frango em 11,4%. Outros alimentos envolvidos foram capeleti (3,8%), lasanha (2,8%), carne bovina (2,5%), rizoto (1,3%) e bacon (1,2%).

Van Amson et al. (2006) fizeram um levantamento de dados epidemiológicos relativos aos surtos d DVA no estado do Paraná, no período de 1978 a 2000 e verificaram que dos 1.195 surtos causados por agentes bacterianos a *Salmonella* spp. estava presente em 404 (33,8%) dos surtos.

Dados epidemiológicos dos surtos de salmonelose humana notificados no Paraná, foram investigados por Kottwitz et al. (2010), no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2008 Entre os 286 surtos notificados, 254 foram diagnosticados laboratorialmente, e destes, a confirmação do sorotipo foi

realizada em 310 cepas de *Salmonella* spp., sendo 123 cepas isoladas de pacientes e 187 de alimentos. Quando foram estudados os tipos de preparações à base de ovos, 40 (21,4%) das 187 cepas analisadas foram isoladas de bolo, 38 de maionese (20,7%) e seis de ovos (3,6%). O bolo foi um dos alimentos com mais frequência no período de estudo, entretanto, a maionese superou este alimento em 2002 e no período de 2004 a 2008. Na categoria de carnes e derivados, 39 (20,8%), pratos prontos à base de carnes suínas, bovinas e de aves, 26 (14,0%) diferentes embutidos frescos e defumados foram implicados nos surtos.

Scallan et al (2011) estimaram que nos Estados Unidos os alimentos envolvidos em surtos estavam contaminados com 31 diferentes agentes etiológicos, vitimando cerca de 9,4 milhões de indivíduos, 55.961 hospitalizações e 1.351 mortes. Destes surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), 59% foram causados por vírus, 39% por bactérias e 2% por parasitas. Os principais patógenos isolados dos indivíduos doentes foram norovírus (58%), *Salmonella* spp. (11%), *Clostridium perfringens* (10%) e *Campylobacter* spp. (9%). Os agentes responsáveis pela hospitalização dos indivíduos doentes foram *Salmonella* spp. (35%), norovírus (26%), *Campylobacter* spp. (15%) e *Toxoplasma gondii* (8%). E os principais microrganismos causadores de morte foram *Salmonella* spp. (28%), *Toxoplasma gondii* (24%), *Listeria monocytogenes* (19%) e norovírus (11%).

Nos países da União Europeia (UE), os sorotipos mais comuns de *Salmonella* spp. isolados em 2010 e 2011 (**TABELA 4**) foram *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, representando 44,4% e 24,9%, respectivamente, de todos os sorotipos relatados em casos humanos confirmados (n=77.421). *Salmonella* Infantis foi o terceiro sorotipo mais comum na UE desde 2006, com aumento de 1,0% em 2006 para 2,2% em 2010. Casos de *Salmonella* Kentucky e *Salmonella* Virchow diminuíram cerca de 30% de 2010 a 2011. Sorotipo *Salmonella* Poona, com 548 casos notificados, apareceu na lista em 2011, sendo que grande parte desses casos eram de um surto em crianças na Espanha, devido ao leite contaminado (EFSA, 2013).

**TABELA 4.** Distribuição de casos confirmados notificados de salmonelose humana por 10 diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. mais frequentes nos países da União Europeia (2010-2011).

ANO 2010			ANO 2011		
SOROTIPOS	CASOS	%	SOROTIPOS	CASOS	%
<i>Salmonella</i> Enteritidis	36.466	44,2	<i>Salmonella</i> Enteritidis	34.385	44,4
<i>Salmonella</i> Typhimurium	21.223	25,7	<i>Salmonella</i> Typhimurium	19.250	24,9
<i>Salmonella</i> Infantis	1.793	2,2	<i>Salmonella</i> Typhimurium, monophasic 1,4,[5],12:i:-	3.666	4,7
<i>Salmonella</i> Typhimurium, monophasic 1,4,[5],12:i:-	1.426	1,7	<i>Salmonella</i> Infantis	1.676	2,2
<i>Salmonella</i> Newport	839	1,0	<i>Salmonella</i> Newport	771	1,0
<i>Salmonella</i> Kentucky	783	0,9	<i>Salmonella</i> Derby	704	0,9
<i>Salmonella</i> Virchow	689	0,8	<i>Salmonella</i> Kentucky	559	0,7
<i>Salmonella</i> Derby	665	0,8	<i>Salmonella</i> Poona	548	0,7
<i>Salmonella</i> Mbandaka	471	0,6	<i>Salmonella</i> Virchow	467	0,6
<i>Salmonella</i> Agona	445	0,5	<i>Salmonella</i> Agona	459	0,6
Outros	17.657	21,4	Outros	14.936	19,3
<b>TOTAL</b>	<b>82.457</b>	<b>100</b>	<b>TOTAL</b>	<b>77.421</b>	<b>100</b>

FONTE: EFSA (2013).

#### 2.4.4 Principais alimentos contaminados por salmonelas

Uma ampla variedade de alimentos contaminados é associada às salmoneloses, incluindo carne bovina crua, carne de aves, ovos, leite e derivados, peixes, camarões, carne de rã, fermentos, côcos, molhos e temperos para salada, misturas para bolo, sobremesas recheadas e cobertas com cremes, gelatina desidratada, manteiga de amendoim, cacau e chocolates. A contaminação do alimento ocorre devido ao controle inadequado de temperatura, de práticas de manipulação ou por contaminação cruzada de alimentos crus com alimentos processados. O microrganismo se multiplica no alimento até atingir a dose infectante (FORSYTHE, 2002).

Os produtos à base de carne são particularmente suscetíveis à contaminação por *Salmonella* spp. As fontes de bactérias são os tratos intestinais de muitos animais, e a carne, especialmente de frango, pode ser contaminada facilmente nas fábricas de processamento (TORTORA et al., 2012).

Para Pardi et al. (1995), o hambúrguer é um dos produtos mais comprometidos por surtos de salmoneloses, sendo que um dos fatores

contribuintes para esta ocorrência é o consumo de produtos crus ou mal cozidos contendo *Salmonella* spp. em níveis infectantes.

Nas infecções humanas todos os produtos de origem animal são passíveis de estarem contaminados com salmonelas viáveis. As carnes e os produtos cárneos estão entre os alimentos mais suspeitos, sendo a carne picada a mais susceptível. Os embutidos frescos como as linguiças, os hambúrgueres e outros também representam graves riscos de contaminação (PARDI et al., 1995; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Aves e seus produtos, especialmente ovos crus ou inadequadamente cozidos são responsáveis por quase metade de todos os surtos de salmoneloses. Carnes, particularmente a bovina e a suína, são responsáveis por 13% dos surtos (PELCZAR JR et al., 2005).

Os alimentos mais comumente implicados em surtos foram refeições mistas, ovos e produtos relacionados com ovos, sobremesas, água, matérias e alimentos processados a base de carne, leite e produtos lácteos, frango e carne de porco. A maioria destes surtos foram causados por bactérias, principalmente, *Salmonella* spp., seguido por *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Shigella* spp. e *Clostridium botulinum* (ARAÚJO et al., 2002; BRASIL, 2011; GOMES et al. 2013).

No Brasil, estudos realizados com carne crua moída e/ou em cortes indicaram que a prevalência de *Salmonella* spp. é cerca de 10% a 20% (ALMEIDA et al., 2002; GOMES et al. 2013; SIGARINI et al., 2006)

Segundo uma tendência mundial, no Brasil a *Salmonella* Enteritidis tem sido associada a infecções humanas de origem alimentar causada pela ingestão de alimentos de origem animal contaminados, principalmente carne de aves mal cozida e ovos (VAZ et al., 2010). Geimba et al. (2004) afirmaram que, embora o Brasil seja o segundo maior produtor de carne de frango no mundo, poucos estudos têm sido realizados para pesquisa de *Salmonella* spp.

Gutiérrez-Cogco et al. (2000), isolaram *Salmonella* spp. de alimentos, sendo 51% correspondiam a alimentos preparados; 23% de produtos cárneos (produtos derivados da carne como presunto, salsicha, linguiça, etc.); 22% de carne fresca (carne moída, frango, peixe); 3% de produtos lácteos e 1% de ovos (frescos e em pó).

Segundo a Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (EFSA, 2013), nos países da Comunidade Europeia (CE), *Salmonella* Enteritidis é mais

comumente associada com o consumo de ovos e carne de aves contaminadas, enquanto que *Salmonella* Typhimurium é principalmente associada com o consumo de carnes de porco, bovina e de aves contaminadas.

#### **2.4.5 Fatores que favorecem a contaminação dos alimentos por salmonelas**

A contaminação de carcaças, dos animais abatidos, por material fecal é esperada durante e imediatamente após o abate. Além disso, a infecção dos seres humanos e dos outros animais por *Salmonella* spp. é adquirida mediante ingestão de alimentos contaminados por fezes contendo a bactéria. Esta contaminação dos alimentos acontece de forma direta ou indireta podendo ser caracterizado o papel desempenhado pelos alimentos (contaminação cruzada), dedos, fezes e moscas, o que na língua inglesa é conhecido como quatro "efes" (4F – "Food", "Fingers", "Feces", "Flies"). Também tem-se observado que os produtos não cozidos suficientemente ou que não estiveram sob refrigeração apropriada são os que oferecem maiores riscos de estarem contaminados, sendo a manipulação excessiva destes produtos um agravante a mais (JAY, 2005; PARDI et al., 1995).

Seres humanos podem disseminar salmonelas para outros seres humanos. Portadores assintomáticos e pessoas doentes, que excretam salmonelas nas fezes, podem contaminar suas mãos e se estas estão envolvidas na preparação de alimentos, caso haja prática inadequada de higienização de mãos, poderão contaminar estes alimentos. Além disso, se o alimento for estocado em local não refrigerado pode haver multiplicação microbiana alcançando número suficiente para causar a doença. Utensílios de cozinha e tábuas de corte inadequadamente limpos podem apresentar restos de alimentos contaminados constituindo uma fonte contínua de contaminação cruzada. Também as fezes humanas ou de outros animais podem contaminar a água de abastecimento público e causar infecções por *Salmonella* spp. (PELCZAR JR et al., 2005).

Um portador assintomático é definido como uma pessoa ou um animal que excreta frequentemente *Salmonella* spp., normalmente pelas fezes, sem apresentar qualquer sinal ou sintoma da doença. Além disso, as salmonelas são



eliminadas rapidamente do trato intestinal onde mais de 5% dos pacientes tornam-se portadores após a cura da doença (JAY, 2005).

#### **2.4.6 Prevenção e controle das doenças causadas por salmonelas**

Três fatores, em particular, influenciaram economistas e outros pesquisadores para dirigirem suas atenções ao impacto financeiro e social devido à infecção por *Salmonella* spp. O primeiro foi o aumento acentuado no número de casos de infecção causada por *Salmonella* spp. Em segundo, há um reconhecimento do aumento de custos associados com as infecções alimentares por *Salmonella* spp. O terceiro fator, mais geral, foi o crescimento no interesse na esfera da avaliação econômica nos setores dos cuidados médicos e da saúde pública (SOCKETT, 1991).

A salmonelose é um problema persistente ao redor do mundo. Está associada com dificuldades comerciais, prejuízos econômicos e queda na produção. A redução de sua presença é crítica na prevenção da contaminação em plantas de abate e no processamento de produtos de origem animal como ovos, carne e derivados (FLÔRES et al., 2002).

Avaliar economicamente os custos totais da salmonelose é geralmente útil, primeiro em trazer à atenção do público uma doença que pode ser; e, em segundo lugar, essencialmente naquelas áreas, particularmente no setor público, que consomem recursos. Entretanto, terceiro e provavelmente a mais valiosa contribuição, diz respeito à avaliação dos procedimentos projetados para limitar ou prevenir a propagação da infecção (SOCKETT, 1991).

A prevenção depende de boas medidas de saneamento para deter a contaminação e de refrigeração correta para impedir o aumento no número de bactérias (TORTORA et al., 2012). Segundo Pardi et al. (1995), para prevenir a salmonelose deve-se obedecer os princípios fundamentais para se evitar a contaminação de alimentos manipulados por pessoas doentes e provenientes de animais igualmente doentes ou portadores de materiais contaminados como carnes, ovos e ingredientes em geral, não se esquecendo a importante atenção para as possibilidades da contaminação cruzada.

Pelczar Jr et al. (2005), descreveram que as principais medidas de prevenção de infecção por *Salmonella* spp. são: (1) cozimento adequado dos alimentos de origem animal a fim de destruir as possíveis salmonelas presentes

no alimento; (2) conservação dos alimentos a temperaturas adequadas de refrigeração e/ou congelamento, evitando a multiplicação das salmonelas; (3) proteção do alimento do contato com roedores, moscas e outros animais que possam veicular salmonelas a partir de outros alimentos contaminados; (4) análise periódica de amostras de fezes de manipuladores de alimentos pela saúde coletiva, com a finalidade de detectar portadores; (5) inspeção periódica de locais de processamento de alimentos pela saúde coletiva visando à detecção de produtos alimentícios contaminados por salmonelas; e (6) boas práticas pessoais sanitárias e higiênicas.

Com relação aos portadores assintomáticos, devem-se incluir exames de fezes entre os exames periódicos normalmente exigidos aos manipuladores de alimentos, sendo que para aqueles positivos recomenda-se o afastamento do manipulador (desvio de função) até que o exame de seis coproculturas indique resultado negativo (PARDI et al., 1995).

As infecções causadas por *Salmonella* spp. são prevenidas principalmente pela saúde pública e por medidas de higiene pessoal. Além disso, têm que ser tomadas medidas importantes tais como: tratamento apropriado das fezes; abastecimento de água clorada e periodicamente monitorado para detecção de bactérias do grupo dos coliformes; culturas de amostras de fezes de pessoas que manipulam alimentos para detectar os portadores; lavagem das mãos antes da manipulação de qualquer alimento; pasteurização de leite e cozimento adequado dos derivados de frango e carne bovina (LEVINSON; JAWETZ, 2006).

Devem-se tomar medidas sanitárias para evitar a contaminação da água e dos alimentos por roedores ou outros animais que excretam salmonelas. É preciso cozinhar totalmente os alimentos. Os portadores não devem trabalhar na manipulação de alimentos e devem seguir precauções higiênicas estritas (JAWETZ et al., 2005).

## 2.5 PESQUISA DE *Salmonella* spp. ATRAVÉS DA METODOLOGIA CONVENCIONAL

Apesar de sua morosidade e labor, o método convencional para detectar a presença de *Salmonella* spp. em alimentos, ainda é amplamente utilizado em laboratórios de controle de qualidade, sendo este, o método oficial recomendado pela legislação brasileira (GIOMBELLI; SILVA, 2002).

O método convencional de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos foi desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção mesmo em situações extremamente desfavoráveis, como ocorre em alimentos com uma microbiota competidora muito maior do que a população de *Salmonella* spp. e/ou alimentos em que as células de *Salmonella* spp. se encontram injuriadas e/ou estressadas pelo processo de preservação, como a aplicação de calor, congelamento e/ou secagem. A metodologia recomendada pode apresentar algumas variações na escolha dos meios de cultura e forma de preparação das amostras, mas segue basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento: pré-enriquecimento em caldo não seletivo; enriquecimento em caldo seletivo; plaqueamento seletivo diferencial (isolamento e seleção); confirmação (identificação bioquímica e prova de soroglutinação) (BRASIL, 2003; SILVA et al., 2007).

O isolamento de *Salmonella* spp. exige o uso de meios de cultura que cumpram dois atributos: um efeito de inibição no crescimento de microrganismos competidores e de uma capacidade discriminadora que permita que *Salmonella* spp. seja reconhecida entre as outras espécies que são igualmente capazes de crescimento no meio (RUIZ et al., 1996).

Métodos de detecção convencionais para *Salmonella* spp. são baseados em culturas usando meios e a caracterização em meios seletivos de colônias suspeitas por testes bioquímicos e sorológicos. Estes métodos são geralmente demorados (SOUMET et al., 1999a, 1999b). O método convencional usado para a detecção de *Salmonella* spp. no alimento depende do pré-enriquecimento e do enriquecimento nos meios seletivos, seguidos pelo isolamento em meios diferenciais e na confirmação sorológica (FERRETTI et al., 2001).

O isolamento e a identificação de *Salmonella* spp. tornou-se um problema aos laboratórios da indústria da carne por causa do longo tempo necessário para se obter resultados com os métodos convencionais de microbiologia, que envolvem o pré-enriquecimento não-seletivo, seguidos pelo enriquecimento seletivo e o plaqueamento seletivo em Ágares diferenciais. As colônias suspeitas são então confirmadas bioquimicamente e sorologicamente. Este método pode ser aplicado a qualquer tipo de alimento, mas a limitação principal deste método é a demora, exigindo de cinco a sete dias, para a confirmação da presença das *Salmonella* spp. em uma amostra. O teste completo exige de três a quatro dias para obter um resultado negativo e até sete dias para que um resultado positivo

seja confirmado, sendo que durante estes dias, os estoques de alimentos que estão sendo analisados são proibidos de serem comercializados (BENNETT et al., 1998; DE ZUTTER et al., 1991; FERRETTI et al., 2001; FRANCHIN et al., 2006; MANAFI; WILLINGER, 1994; OLIVEIRA et al., 2003; STONE et al., 1994; VIEIRA-PINTO et al., 2007; WAAGE et al., 1999).

No geral estas etapas incluem o pré-enriquecimento para permitir a regeneração e a multiplicação das células de *Salmonella* spp. injuriadas, o enriquecimento seletivo para aumentar a relação das células de *Salmonella* spp. aos microrganismos competidores, e o plaqueamento em meios seletivos/diferenciais para permitir o reconhecimento e isolamento das colônias de *Salmonella* spp. ao suprimir o crescimento da microbiota competidora. A confirmação bioquímica e sorológica segue se ocorrer o desenvolvimento de colônias *Salmonella* spp. típicas nos meios seletivos/diferenciais. Estes métodos fornecem um nível teórico de sensibilidade de uma célula de *Salmonella* spp. por 25 gramas do alimento, mas a detecção pode ser impedida pela presença de outros microrganismos que podem competir com *Salmonella* spp. durante o enriquecimento (BECKERS et al., 1987; BLACKBURN, 1993; FRICKER, 1987).

### **2.5.1 Pré-enriquecimento em caldo não seletivo**

Baseia-se na inoculação e incubação, a  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 16 a 20 horas, de  $25\pm 0,2$  gramas (g) ou mililitros (mL) da amostra, adicionada de 225 mL de Solução Salina Peptonada Tamponada (SSPT) ou Água Peptonada Tamponada (APT). Esse procedimento visa minimizar os efeitos do processamento industrial dos alimentos, capaz de promover estresse nas células de *Salmonella* spp., sem inativá-las biologicamente. Além disso, a SSPT ou a APT favorecem a manutenção do pH, evitando que as bactérias acompanhantes acidifiquem o meio, prejudicando a recuperação das células de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2003).

O isolamento de *Salmonella* spp. é influenciado particularmente pela presença de microrganismos competidores. Entretanto esta microbiota competidora não é representativa da microbiota que ocorre naturalmente no alimento. Adicionando o material de referência a uma mistura da Água Peptonada Tamponada e do alimento a ser examinado, antes da incubação, os microrganismos competidores que ocorrem naturalmente no alimento podem ser

inativados (BECKERS et al., 1985). Tais procedimentos diagnósticos incluem geralmente o pré-enriquecimento de uma amostra de alimento em um meio não-seletivo para facilitar e/ou permitir o reparo das células de *Salmonella* spp. estressadas ou injuriadas, encontradas frequentemente em alimentos crus e processados, e sua subsequente multiplicação. O crescimento deve conduzir a um número suficientemente elevado destes organismos para assegurar a sobrevivência à exposição a um meio altamente seletivo de enriquecimento na próxima etapa (D'AOUST et al., 1992; VAN SCHOTHORST; RENAUD, 1985).

Para Fricker (1987), os termos regeneração ou pré-enriquecimento são usados frequentemente sem a consideração devida do seu real significado e o termo cultura do pré-enriquecimento denota geralmente uma cultura que seja feita por duas razões. A inoculação direta de uma amostra naturalmente contaminada em meios de enriquecimento seletivos conduz frequentemente a uma falha ao recuperar os organismos de interesse. Isto pode ocorrer por duas razões. Algumas células bacterianas íntegras são destruídas frequentemente quando adicionadas aos meios de enriquecimento seletivos e assim caso estejam em baixos números estes meios podem conduzir à destruição de toda a população do microrganismo de interesse. A cultura do pré-enriquecimento permite que o número de microrganismos aumente, reduzindo assim os efeitos prejudiciais das destruições iniciais. Além disso, células injuriadas são mais sensíveis aos agentes seletivos do que as células não injuriadas e, desde que a maioria de técnicas do enriquecimento foi projetada usando células saudáveis, a concentração de agentes seletivos atuais em meios de enriquecimento não podem facilitar a recuperação de organismos injuriados. Neste caso o pré-enriquecimento permite as células de interesse reparar todas as lesões e iniciarem assim sua resistência aos agentes seletivos, antes do enriquecimento. Em muitos casos pode-se tentar recuperar um pequeno número de células injuriadas e assim ambos os eventos ocorrem durante o pré-enriquecimento, logo, as células injuriadas podem se reparar e se multiplicarem antes que sejam expostas aos agentes seletivos.

### **2.5.2 Enriquecimento em caldo seletivo**

Utiliza-se meios de cultura que contêm substâncias de ação que impedem o crescimento da maioria dos microrganismos interferentes e na incubação em

temperatura de 36°C ou 41°C±0,5°C por 24 a 30 horas. O enriquecimento seletivo de *Salmonella* spp. se faz obrigatoriamente em meios líquidos seletivos, Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e Caldo Selenito Cistina (SC). Adicionalmente utiliza-se o Caldo Tetrionato (TT). No Caldo RV, a presença de Verde Malaquita e de Cloreto de Magnésio, associada à temperatura seletiva, atua como agentes seletivos da microbiota acompanhante, enquanto a presença de Peptona de farinha de soja estimula o crescimento de *Salmonella* spp. No Caldo SC, o agente inibidor Selenito de Sódio atua inibindo os coliformes e *Enterococcus* spp. e no Caldo TT, a seletividade é conferida pelo Tetrionato e pelo Verde Brilhante (BRASIL, 2003).

Busse (1995) afirmou que estes meios seletivos de enriquecimento são geralmente para suprimir a microbiota acompanhante, tanto quanto as bactérias Gram-positivas. Os meios seletivos para *Salmonella* spp. são eficientes. Sendo que aqueles que contêm o selenito ou o tetrionato mais o verde brilhante e o verde da bÍlis ou então verde malaquita em combinação com quantidades elevadas de cloreto de magnésio são as ferramentas predominantes para o enriquecimento seletivo. Entretanto Patil e Parhad (1986), além de confirmarem que os meios de enriquecimento são importantes no isolamento de *Salmonella* spp. pois estes microrganismos estão frequentemente em menor número se comparados com a maioria dos outros microrganismos, também salientaram que os meios de enriquecimento foram desenvolvidos inicialmente para isolar *Salmonella* spp. das fezes e foram aplicados subsequentemente a outros materiais tais como os alimentos e a água.

Contudo, Busse (1995) descreveu que o processo de isolamento de *Salmonella* spp. dos alimentos é de certa forma propenso a falhas. O risco principal está provavelmente na amostragem, mas mesmo se uma parcela contaminada foi extraída, células bacterianas podem ser perdidas durante o enriquecimento. Se *Salmonella* spp. domina a microbiota do caldo de enriquecimento encontrar-se-ão suas células em todos os casos. Entretanto, se *Salmonella* spp. for minoria entre os microrganismos concorrentes a detecção pode não ser bem sucedida.

Um meio de enriquecimento, incluindo as condições de enriquecimento constitui indubitavelmente em um sistema ecológico. A parte da microbiota original do substrato é suprimida pelo procedimento. Depois do pré-enriquecimento, replica-se parte da cultura inoculando-se geralmente em dois

caldos seletivos de enriquecimento. A recuperação bem sucedida das células de *Salmonella* spp. nos caldos de enriquecimento reduzem a relação elevada de outros microrganismos competidores. Aqueles organismos, entretanto, que são suficientemente competentes sob tais circunstâncias e prevalecerem, competirão para o domínio. Tal mudança em populações microbianas potencializa o isolamento de *Salmonella* spp. nos meios do plaqueamento. Em grande parte depende do resultado desta competição para um meio ser considerado seletivo ou não. Isto significa que a seletividade de um meio ocorre em função do substrato analisado. Sendo importante dar-se conta que a escolha do caldo de enriquecimento pode afetar o desempenho do método (BUSSE, 1995; D'AOUST et al., 1992).

Fricker (1987) resumiu, de forma geral, que o objetivo de culturas de enriquecimento é promover o crescimento de tipos fisiológicos particulares de microrganismos em uma mistura contendo outros microrganismos, tais que se transformem em um componente principal da microbiota. Os protocolos de enriquecimento podem ser eletivos ou seletivos. Os procedimentos eletivos envolvem o uso dos meios que permitirão o crescimento de um único ou um pequeno número de tipos de bactérias baseadas na combinação original de atributos nutritivos e/ou fisiológicos do microrganismo exigido. Os procedimentos seletivos de enriquecimento envolvem substâncias inibitórias ou procedimentos para impedir o crescimento da maioria dos microrganismos, mas permitindo, para incentivar embora não necessariamente, o crescimento dos microrganismos desejados.

### **2.5.3 Plaqueamento seletivo diferencial (isolamento e seleção)**

A partir da seleção de colônias típicas e isoladas de *Salmonella* spp. em, pelo menos, dois meios sólidos: o Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (VB) obrigatoriamente e outro Ágar de escolha que também sirva como seletivo diferencial, tais como: Ágar Rambach (RA); Ágar *Salmonella* Diferencial (ASD); Ágar Hektoen (HE); Ágar *Salmonella-Shigella* (SS); Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD); Ágar Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4); Ágar Manitol Lisina Cristal Violeta Verde Brilhante (ML). No Ágar VB, a Novobiocina adicionada visa principalmente a inibição de *Proteus* spp. Além disso, este meio apresenta Bile Bovina e um corante derivado do Trifenilmetano (Verde

Brilhante), responsáveis pela inibição de microrganismos Gram-positivos. No Ágar RA, a diferenciação entre *Salmonella* spp. e outros microrganismos acontece pela presença de Propilenoglicol e também de um cromógeno que evidencia a hidrólise da Beta-galactosidase. No Ágar ML, a concentração de íons Magnésio promove o crescimento de *Salmonella* spp. e a presença de Verde Brilhante inibe a microbiota acompanhante (BRASIL, 2003).

A escolha do meio seletivo de plaqueamento recebe frequentemente uma atenção especial. O uso de meios apropriados de plaqueamento é crucial, entretanto, para o isolamento eficiente de todas as bactérias, estas devem ser capazes de crescer em meios sólidos. Os meios eficazes de plaqueamento devem ter diversas características. Devem suportar o crescimento de uma escala ampla de diferentes tipos específicos e devem, na medida do possível, inibir o crescimento de outras bactérias. Além disso, os microrganismos que estão sendo pesquisados devem facilmente ser distinguidos de outros que podem formar colônias no mesmo meio. A aparência diferencial aumenta não somente as possibilidades de isolamento bem sucedido, mas também diminui o número de colônias que precisam ser selecionadas por métodos bioquímicos e fisiológicos para confirmar o isolamento do microrganismo (FRICKER, 1987).

Para Busse (1995) os meios de plaqueamento para ao isolamento de *Salmonella* spp. podem ser subdivididos em três grupos de acordo com os agentes seletivos usados. Estes são o Ágar de Sais Biliares, o Ágar Verde Brilhante e o Ágar Bismuto Sulfito.

Cooke et al. (1999) descreveram que há uma escala de Ágares diferenciais seletivos que distinguem as bactérias entéricas sendo aplicados para a detecção de *Salmonella* spp. Estes incluem o Ágar Xilose Lisina Desoxicolato; Ágar Verde Brilhante; Ágar Verde Brilhante modificado; Ágar Hektoen entérico; Ágar Verde Brilhante de Cristal Violeta de Manitol Lisina; Ágar *Salmonella-Shigella*; Ágar Citrato de Desoxicolato; e Ágar Sulfito Bismuto. A seletividade destes Ágares é devido a presença de sais biliares (ou de outros compostos surfactantes) e de inibidores tais como o verde brilhante. A diferenciação da maioria de *Salmonella* spp. de outros organismos, particularmente os membros da família das Enterobacteriaceae, deve-se a habilidade de produzir o sulfureto de hidrogênio e/ou a inabilidade de fermentar a lactose diminuindo o pH do meio.



#### **2.5.4 Identificação bioquímica**

As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. são testadas em meios que fornecem indicações sobre as características bioquímicas de *Salmonella* spp., as quais servem para triagem. Os meios utilizados são: Ágar Três Açúcares Ferro (TSI); Ágar Lisina Ferro (LIA); Ágar Kliger (KIA) (SIQUEIRA, 1995).

#### **2.5.5 Provas bioquímicas complementares**

Evidenciação das propriedades fisiológicas e metabólicas das culturas suspeitas por meio da verificação da: presença de Citocromo Oxidase; produção da Urease; fermentação da Glicose, Sacarose e Lactose no meio TSI; detecção de  $\beta$ -galactosidase; descarboxilação da Lisina; produção de Sulfeto ( $H_2S$ ); motilidade e produção de Indol. Para as provas bioquímicas utilizam-se os seguintes meios de cultura: Caldo Uréia; Meio SIM; Prova da Oxidase; Ágar Fenilalanina; Caldo VM-VP; Ágar Citrato (BRASIL, 2003).

#### **2.5.6 Prova de soroaglutinação (sorologia)**

A prova de soroaglutinação fundamenta-se na reação antígeno-anticorpo, com conseqüente aglutinação do antígeno frente ao anti-soro para *Salmonella* spp. polivalente O (BRASIL, 2003).

### **2.6 SISTEMA BACTRAY®**

O sistema Bactray® é destinado à identificação bioquímica de bacilos Gram-negativos com oxidase negativa, fermentadores da glicose ou não e bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose, com oxidase positiva. Este sistema é composto por três conjuntos de provas bioquímicas, denominados Bactray® I, II e III. Para identificação de fermentadores da glicose e bactérias não-fermentadoras oxidase negativas utiliza-se o Bactray® I e II, sendo que para os não fermentadores oxidase positiva é utilizado o Bactray® III. Cada conjunto é composto por um suporte de poliestireno descartável que contém dez compartimentos para execução das provas bioquímicas (LABORCLIN, 2009).

## 2.7 PESQUISA DE *Salmonella* spp. ATRAVÉS DE MEIOS CROMOGÊNICOS

Segundo Reis e Camargo (2008), os meios cromogênicos são utilizados com a finalidade de diferenciar e isolar as espécies de *Salmonella* spp. de outros gêneros e também entre as outras diversas espécies. Pois, conforme afirmou Manafi (2000), os meios convencionais para a detecção de *Salmonella* spp. tem uma especificidade muito pobre e cria uma abundância de falsos positivos (tal como *Citrobacter* spp. e *Proteus* spp.) entre reais raras *Salmonella* spp. positivas. A carga desnecessária de trabalho para a análise das colônias suspeitas pode frequentemente falhar no teste rotineiro. O uso de novos meios cromogênicos e fluorogênicos traz um diagnóstico de *Salmonella* spp. mais fácil e rápido.

Desde a década de 70, são realizadas pesquisas específicas no sentido de identificar os microrganismos de interesse que levaram ao desenvolvimento dos meios cromogênicos e/ou fluorogênicos. Nesses meios, as colônias, dependendo das enzimas bacterianas que atuam sobre os substratos presentes, adquirem cores e/ou fluorescências características capazes de identificar os microrganismos. Estes meios, além dos compostos nutricionais, dispõem de substratos para a detecção de atividades enzimáticas específicas de cada espécie ou grupo microbiano, garantindo assim uma maior segurança e rapidez na detecção dos microrganismos (TSORAEVA; MARQUES, 2005).

Estes meios podem ser usados diretamente após um cultivo primário, suprimindo a necessidade de longos procedimentos de isolamento e identificação. O uso de substratos sintéticos permite que várias reações possam ser analisadas simultaneamente em uma mesma placa. Os grupos cromóforos e/ou fluoróforos são associados a diferentes tipos de substratos de origem protéica, glicosídica, alcoólica entre outras, o que, comparativamente aos meios tradicionais, confere aos meios cromogênicos e/ou fluorogênicos maior exatidão diagnóstica (BASCOMBS, 1987; MANAFI et al., 1991; MANAFI, 1996; TSORAEVA; MARQUES, 2005).

Quanto mais substratos enzimáticos forem adicionados ao meio, mais grupos microbianos de interesse podem ser detectados. Essa integração de substratos é possível, pois não há interferência entre a microbiota. Um mesmo meio pode conter diferentes grupos cromóforos com distintas características cromáticas que determinarão as cores observadas nas colônias. Como

consequência, há uma economia de tempo, material e pessoal para identificação (TSORAEVA; MARQUES, 2005).

Reconhecendo os limites das características fenotípicas atualmente utilizadas, Rambach (1990) desenvolveu um meio que facilitou a identificação presuntiva de *Salmonella* spp. e diferenciou claramente as colônias de *Salmonella* spp. das colônias de *Proteus* spp., assim como de colônias de outros membros da família Enterobacteriaceae. Sendo igualmente desejável, já que *Salmonella* spp. é o microrganismo preliminar de interesse, que as colônias de *Salmonella* spp. sejam coloridas distintamente para facilitar o reconhecimento das outras colônias.

Rambach (1990) encontrou uma característica fenotípica nova, a formação de ácido a partir do Glicolpropileno (Glicol de Propileno ou Glicol Propileno ou Propilenoglicol), sendo que esta característica poderia ser usada no lugar da produção do Sulfureto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S) para identificar *Salmonella* spp. em meios seletivo. Organismos que utilizam a Lactose podiam ser identificados usando um indicador cromogênico da β-Galactosidase, diferenciando desse modo *Salmonella* spp. dos outros membros que utilizam a Lactose da família de Enterobacteriaceae. O Desoxicolato foi incluído como um inibidor de organismos Gram-positivos, mas todos os compostos foram usados nas concentrações que são geralmente não-inibitórias para os microrganismos patogênicos e coliformes.

No meio Ágar Rambach é usado a habilidade da *Salmonella* spp. de produzir ácido à partir do Glicol Propileno diferenciando-a de outras bactérias entéricas. Além disso, a presença do substrato cromogênico X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D-Galactopiranoside) permite detectar a produção de β-D-Galactosidase por outra enterobactéria. Culturas de *Salmonella* spp. são positivas somente na primeira reação (produção de ácido à partir de Glicol Propileno) e crescem como colônias vermelhas brilhantes, enquanto que a *Escherichia coli* e outros coliformes são positivas somente para β-D-Galactosidase e apresentam-se como colônias azuis. *Proteus* spp. são negativos para ambas reações, então suas colônias são transparentes. *Citrobacter* spp. apresentam-se como colônias violetas devido a combinação de cores (vermelho e azul), pois ocorrem as duas reações (GARRICK; SMITH, 1994; PIGNATO et al., 1995). Manafi (1996; 2000) também afirmou que os substratos cromogênicos da enzima são os compostos que atuam como o substrato para enzimas específicas e mudam a cor devido à

ação da enzima. Geralmente, baseado em sua reação química, quatro grupos de compostos cromogênicos podem ser distintos, os derivados de Indolil que são solúveis em água e termoestáveis e os derivados usados na maior parte tais como 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil (incolor), 5-Bromo-6-Cloro-3-Indolil (magenta) ou 6-Cloro-3-Indolil (salmão) que não mostram nenhuma difusão na placa de Ágar.

A habilidade de detectar a presença de uma enzima específica e exclusiva usando substratos apropriados, em particular fluorogênicos ou cromogênicos da enzima, conduziu ao desenvolvimento de um grande número de métodos para a identificação de microrganismos mesmo em meios de isolamento preliminar. A incorporação de tais substratos em um meio seletivo pode eliminar a necessidade para a subcultura e promover testes bioquímicos para estabelecer a identidade de determinados microrganismos (MANAFI, 2000).

## 2.8 PESQUISA DE *Salmonella* spp. ATRAVÉS DO MÉTODO SALMOSYST

O método Salmosyst é um sistema de enriquecimento duplo com um enriquecimento preliminar não-seletivo em Caldo Base Salmosyst (CBSY) contendo somente nutrientes, eletrólitos e substâncias tampões que regulam o pH. Para a fase de enriquecimento, agentes seletivos são adicionados na forma de comprimidos de suplemento seletivo Salmosyst. Estes comprimidos dissolvem-se gradualmente durante 30 minutos produzindo um gradiente seletivo no meio, permitindo uma adaptação progressiva das células de *Salmonella* spp. ao meio seletivo, aumentando suas chances de sobrevivência (FIERENS; HUYGHEBAERT, 1996).

Após a fase de enriquecimento utiliza-se um meio de Ágar cromogênico seletivo e diferencial para distinguir *Salmonella* spp. de outras bactérias entéricas. Os componentes principais deste meio são Glicolpropileno; Desoxicolato de Sódio; indicador de pH Vermelho Neutro e um substrato cromogênico  $\beta$ -Galactosidase. A diferenciação da bactéria é baseada na formação de ácido a partir do Glicolpropileno pela *Salmonella* spp. e/ou atividade de  $\beta$ -Galactosidase (FIERENS; HUYGHEBAERT, 1996; RAMBACH, 1990). A partir das colônias rosas ou vermelhas, no meio de Ágar cromogênico, as colônias típicas são submetidas à identificação bioquímica e sorologia (PIGNATO et al., 1995).

## 2.9 CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS

A Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) em placas é o método mais utilizado para indicar as populações bacterianas em alimentos. Não há diferenciação dos tipos de bactérias, sendo utilizada para a obtenção de informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de fabricação, qualidade das matérias primas utilizadas, condições de processamento, qualidade de manipulação e validade comercial do produto. A CBHAM torna-se útil na avaliação da qualidade do produto, pois populações altas de bactérias podem indicar deficiências na sanitização ou falha no controle do processo ou dos ingredientes (SILVA et al., 2007).

Em um alimento a CBHAM expressa o número de bactérias aeróbias ou facultativas e mesófilas presentes tanto sob forma vegetativa quanto esporulada. Sendo usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos. Sua presença em grande número pode indicar matérias primas excessivamente contaminadas; limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas; higiene inadequada na produção; e condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou a conservação dos alimentos, ou a combinação destas circunstâncias (SIQUEIRA, 1995).

Não há uma legislação em relação ao padrão microbiológico de CBHAM em hambúrgueres. Porém, Silva et al. (2007) e Morton (2001) descreveram que o número máximo de tais microrganismos, em carne moída crua, não deve ultrapassar  $1,0 \times 10^5$  UFC/g.

A CBHAM é o método mais utilizado para determinar o número de células viáveis ou Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em um produto alimentar. Através deste método, porções de amostras de alimentos são homogeneizadas, diluídas serialmente em um diluente apropriado, plaqueados sobre a superfície do meio – Método “Spread Plate” – ou dentro de um meio adequado – Método “Pour Plate” – o qual é incubado sob temperatura apropriada por um determinado tempo, sendo então todas as colônias visíveis contadas (JAY, 2005). Transcorrido o tempo de incubação, considera-se para contagem, somente as placas que apresentarem de 30 a 300 UFC. Multiplica-se pelo respectivo fator de diluição e expressa-se o resultado em UFC por grama da amostra (UFC/g) (SIQUEIRA, 1995).

## 2.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação em cadeia da polimerase ("Polimerase Chain Reaction" – PCR) é um método baseado na amplificação enzimática de um fragmento de DNA pela extensão de dois oligonucleotídeos ("primers" ou iniciadores), que hibridam com as fitas complementares de uma sequência-molde (alvo ou "template"). As extremidades 3' dos "primers" são orientadas apontando uma em direção à outra. Na PCR é utilizada uma enzima DNA-polimerase termoestável para produzir uma amplificação de duas vezes do DNA-alvo a cada ciclo de temperatura. O DNA extraído da amostra, juntamente com "primers" (iniciadores) de oligonucleotídeos específicos da sequência, nucleotídeos, DNA-polimerase termoestável e tampão, é aquecido a 90-95°C para desnaturar (separar) as duas fitas do DNA-alvo. A temperatura na reação é reduzida, em geral para 45°C a 60°C dependendo dos "primers", para permitir a fusão dos "primers" ao DNA-alvo. Cada "primer" é então amplificado pela DNA-polimerase termoestável mediante acréscimo de nucleotídeos complementares ao DNA-alvo, produzindo duas vezes a amostra inicial. O ciclo é então repetido 30 a 40 vezes para se obter uma amplificação do segmento do DNA-alvo de até  $10^5$ - $10^6$  vezes. O resultado, ao final de múltiplos ciclos, é o acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades iniciais são definidas pelas extremidades 5' dos "primers". O segmento amplificado frequentemente pode ser observado em gel de eletroforeses (ALBERTS et al., 2004; CARVALHO et al., 2010; JAWETZ et al., 2005; MULLIS, 1990; MULLIS; FALOONA, 1995; TORTORA et al., 2012; TOZE, 1999; VOGEL; MOTULSKY, 2000).

De uma forma geral, conforme afirmaram Altwegg e Verhoef (1995), as reações em cadeia da polimerase revolucionaram muitos campos dentro das ciências biológicas porque permitiram pela primeira vez uma enorme amplificação de uma parte dada do DNA *in vitro* dentro de um curto período de tempo.

### **2.10.1 Reação em cadeia da polimerase para detecção de microrganismos em alimentos**

Apesar da técnica microbiológica convencional ainda ser a mais utilizada e consagrada (método de referência), ela apresenta protocolos demorados, que

podem atingir mais de sete dias de análise; e protocolos trabalhosos, devido à necessidade de muitos reagentes e vidraria, principalmente se for processado um grande número de amostras, como geralmente é demandado na indústria de alimentos. Neste caso, a técnica, apesar de confiável, passa a se mostrar pouco prática, principalmente para o serviço de inspeção, que necessita de resultados rápidos e seguros, para liberar ou não o produto para o consumo (DE MEDICI et al., 1998; VON RÜCKERT et al., 2006).

Como o procedimento padrão atual de laboratório para cultivar e identificar *Salmonella* spp. são laboriosos podendo durar até sete dias, a PCR representa um avanço principal nos termos da velocidade, da sensibilidade e da especificidade de métodos diagnósticos, sendo usada cada vez mais para identificar diversas espécies bacterianas do alimento e de amostras clínicas (CANDRIAN, 1995; CASTAGNA et al., 2005; FRESCHI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2002; STONE et al., 1994). Além disso Schrank et al. (2001) afirmaram que a grande vantagem da PCR é que pode ser aplicada em espécies microbianas misturadas sem isolamento prévio da espécie individual de bactérias. A capacidade da PCR para detectar sequências genéticas de quantidades mínimas de DNA é vantajosa comparada aos métodos de detecção microbiológicos e sorológicos (SCHRANK et al., 2001).

Porém, a extrema sensibilidade da PCR para a detecção de patógenos em cultura pura não é observada quando a análise é feita diretamente em carnes, fezes, tecidos, sangue e leite. A presença de inibidores, tais como, sais biliares, hemoglobina e componentes sanguíneos inibe a ligação do "primer" com a sequência alvo e diminui a eficiência de amplificação. Desta maneira, o enriquecimento da amostra de alimento em meios de cultura geralmente são pré-requisitos para a análise (FENG, 2001; SOUSA et al., 2007).

A técnica da PCR é considerada altamente sensível e específica e vem sendo empregada com êxito para detecção de vários microrganismos, destacando-se *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli*, além de *Salmonella* spp., em diferentes matrizes, como carnes e leite revelando-se uma técnica rápida e precisa. A PCR permite a replicação *in vitro* de sequências definidas de DNA, não sendo necessário, para isto, conhecer a estrutura completa do DNA alvo, mas apenas aquelas que flanqueiam a região a ser amplificada, definida por "primers" ou iniciadores, que hibridizam com estas

regiões. Devido ao fato da PCR detectar uma região única de um genoma bacteriano, a técnica demonstra maior especificidade quando comparada com os métodos microbiológicos convencionais (DICKEL et al., 2005a, 2005b; SANTOS et al., 1999; SANTOS et al., 2001a; VON RÜCKERT et al., 2006).

### **2.10.2 Pesquisa de *Salmonella* spp. utilizando a reação em cadeia da polimerase**

O método microbiológico convencional ainda é largamente empregado para detecção de *Salmonella* spp., sendo este o método oficial recomendado pela legislação brasileira (GIOMBELLI; SILVA, 2002). Mas o controle das contaminações depende cada vez mais de um incremento na velocidade e precisão dos testes analíticos, principalmente para monitoramento da produção animal, fabricação de alimentos e produto final. Para este fim, uma série de novas técnicas tem sido desenvolvida, destacando-se a reação em cadeia da polimerase (SANTOS et al., 2001a; VON RÜCKERT et al., 2006).

Os laboratórios de diagnósticos têm se preocupado com a diminuição do tempo exigido para o diagnóstico das infecções por *Salmonella* spp. buscando um método mais rápido e mais sensível para a detecção e a identificação das *Salmonella* spp. sendo necessários os sorotipos dos espécimes clínicos. A amplificação das sequências originais do DNA de um organismo usando a PCR melhora a velocidade da detecção e o nível de sensibilidade em que os organismos podem ser detectados e tem sido cada vez mais usada para identificar diversas espécies em alimento e amostras clínicas. Uma outra vantagem é que a PCR não é dependente da utilização de um substrato ou da expressão dos antígenos, contornando desse modo variações fenotípicas em testes padrões bioquímicos e falta de antígenos detectáveis (HOORFAR et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2003; STONE et al., 1994).

Um dos pontos críticos da técnica da PCR usada para diagnóstico de *Salmonella* spp. é a escolha da sequência de DNA a ser amplificada, que deve ser comum à grande maioria dos sorotipos e não apresentar homologia com outros microrganismos (SOUSA et al., 2007). A seleção das sequências que flanqueiam os segmentos de DNA que se pretende amplificar por PCR é um ponto crítico da técnica. A especificidade da PCR decorre da precisão com que os iniciadores desempenham esta tarefa, ou seja, hibridizam com o DNA alvo. Para a detecção



de *Salmonella* spp., a região escolhida deve ser comum à maioria das cepas, codificar para proteínas com importância na patogenicidade da bactéria e não apresentar homologia com outros microrganismos, o que poderia fornecer resultados falsos-positivos. Há vários iniciadores utilizados para detecção de *Salmonella* spp., como *invA*; *agfA*; *IS200*; *hin*; *H-li*; *iagAB*; *spvR*; *viaB*; *mkfA*; *ompC*; *oriC*, sendo que a principal diferença entre os iniciadores é a especificidade. Como exemplo, o gene *invA* está presente nas espécies *Salmonella* Enterica e *Salmonella* Bongori enquanto *iagAB* identifica apenas os sorotipos Enterica subespécie I (BÄUMLER et al., 1997; SANTOS et al., 2001a; SOUSA et al., 2007; STONE et al., 1994; STONE et al., 1995; VON RÜCKERT et al., 2006).

O gene *invA* de *Salmonella* spp. é bastante utilizado para a detecção uma vez que está relacionado com a invasão celular da bactéria, e portanto, detecta praticamente todos os sorotipos patogênicos (VON RÜCKERT et al., 2006). Este gene codifica a proteína interna da membrana das bactérias, sendo necessário para a invasão das células epiteliais (RAHN et al., 1992; ZAHRAEI et al., 2005).

## 2.11 AGENTES ANTIMICROBIANOS

### 2.11.1 Utilização de agentes antimicrobianos

A utilização de agentes antimicrobianos, tanto em humanos quanto em outros animais pode selecionar populações bacterianas resistentes. Nos alimentos dos animais de produção, os agentes antimicrobianos são utilizados para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas associadas às bactérias, bem como para fins de promoção de crescimento. Uma consequência indesejável do uso destes antimicrobianos nesses animais é o potencial de desenvolvimento de microrganismos resistentes e subsequente transmissão para os seres humanos através da contaminação dos alimentos de origem animal (McEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002; WHITE et al., 2002). Segundo Aarestrup (1999), mais da metade de todos os agentes antimicrobianos utilizados está associada com a produção de alimentos de origem animal. Em nível mundial, grandes quantidades de agentes antimicrobianos são usados para promover o crescimento e para fins profiláticos e, em quantidades moderadas, para a terapia. Assim, espécies bacterianas em relação aos produtos de origem animal são expostas a uma

substancial e, em muitos casos, constante pressão seletiva. Para Witte (2004), a pressão seletiva exercida pela utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento em animais produtores de alimentos parece ter criado grandes reservatórios de transferência de resistência aos antimicrobianos nestes ecossistemas.

Schwarz et al. (2001) e Schwarz e Chaslus-Dancla (2001) descreveram que os agentes antimicrobianos utilizados para tratar ou prevenir infecções bacterianas em animais são essencialmente as mesmas classes de compostos que são utilizados na medicina humana, sendo que estes antimicrobianos apresentam quatro maneiras básicas de aplicação: terapia; metafilaxia; profilaxia e promotor de crescimento.

Na terapia os agentes antimicrobianos se destinam a controlar uma infecção bacteriana já existente, geralmente em apenas um indivíduo. A metafilaxia é a aplicação de agentes antimicrobianos em todo o grupo de animais no momento em que apenas um ou alguns indivíduos do grupo apresentam sintomas da doença, porém espera-se que a maioria do grupo possa ser afetada. A aplicação profilática de agentes antimicrobianos pode ser feita tanto em animais individuais quanto em grupos de animais, via alimentos e água. Sendo que este método também apresenta a função de promover o crescimento e aumentar a eficiência alimentar em animais produtores de alimentos (McEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002; SCHWARZ et al., 2001; SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001; VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000).

Confirmando estes modos de aplicação dos agentes antimicrobianos, Aarestrup et al. (1998) descreveram que um grande número de substâncias com atividade antimicrobiana são utilizadas na produção de alimentos de origem animal.

Outros autores (AARESTRUP, 1999; BADA-ALAMBEDJI et al., 2006; CORTEZ et al., 2006; SCHWARZ et al., 2001; SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001; TUNON et al., 2008; VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000) também descreveram que o uso extensivo de antimicrobianos em humanos e outros animais aumentaram a resistência múltipla de fármacos em diferentes cepas bacterianas. O aumento no isolamento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antimicrobianos de casos de salmonelose em humanos tem sido associado ao uso de antimicrobianos em rações animais, principalmente como promotores de crescimento em animais de produção. Esse fato representa um risco para a

saúde coletiva pela transferência de cepas resistentes de *Salmonella* spp. aos humanos em função principalmente do consumo de alimentos contaminados e consequente falhas no tratamento de doenças infecciosas.

### **2.11.2 Resistência de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos**

Cepas de *Salmonella* spp. que são resistentes aos agentes antimicrobianos constituem um risco para a saúde coletiva, por comprometerem o tratamento eficaz de salmoneloses em seres humanos e em outras espécies de animais. Os indivíduos infectados com cepas resistentes aos antimicrobianos são mais propensos a sofrer de um evento adverso à saúde, como doença prolongada, aumento da gravidade da doença, hospitalização ou morte, do que aqueles infectados com cepas sensíveis (AARESTRUP, 1999; COOK et al., 2009). Além disso, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos pode selecionar genes de resistência em bactérias não-patogênicas, que mais tarde poderão transferir a resistência adquirida para diferentes espécies patogênicas de bactérias (AARESTRUP, 1999). Por isso o monitoramento da resistência antimicrobiana é essencial para fornecer informações sobre a magnitude e tendências de resistência e para planejar e monitorar o efeito das intervenções no tratamento (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ et al., 2012).

Segundo Cardoso et al. (2006) os antimicrobianos devem ser utilizados criteriosamente, com base em testes de resistência anteriores e a determinação de doses adequadas por concentração inibitória mínima. Estes objetivos podem ser alcançados pela formação constante de profissionais da saúde em relação a recomendação geral para a utilização destes antimicrobianos, além de um conhecimento mais profundo da sua farmacocinética e, especialmente, o total conhecimento sobre a microbiologia do gênero *Salmonella*.

Para Lundin et al. (2008), a resistência antimicrobiana é uma preocupação crescente para a saúde pública e animal. Sendo que estas ameaças à saúde pública podem vir a partir da transferência de patógenos de animais para pessoas através do contato indireto, como também através dos alimentos ou pelo contato direto com animais. A emergência e a disseminação da resistência antimicrobiana é um problema importante na saúde pública, sanidade animal e segurança alimentar. Corroborando para este fato, Capita et al. (2007), descreveram que os métodos de produção das indústrias de alimentos para

animais e práticas em matadouros podem aumentar a propagação de *Salmonella* spp. entre os animais produtores de alimentos. Na produção primária, existem condições que facilitam a propagação de bactérias, tais como a elevada densidade de animais. Além disso, em matadouros modernos, o rápido aumento da taxa de produção mantém os animais em estreita proximidade entre si ao longo do processamento, levando a transferência de bactérias entre as carcaças.

O surgimento de resistência múltipla é altamente indesejável, sendo possível que a utilização de diferentes agentes antimicrobianos pode selecionar cepas multirresistentes de bactérias patogênicas (AARESTRUP, 1999). Deste modo, o aparecimento substancial de multirresistência em cepas de *Salmonella* spp. de origem alimentar implica na necessidade de um uso mais prudente dos antimicrobianos por parte dos agricultores, veterinários e médicos. Além disso, são necessários esforços para reduzir a prevalência de cepas de *Salmonella* spp. resistentes nos alimentos, incluindo a adoção de diretrizes para um uso mais criterioso de agentes antimicrobianos em animais utilizados para a alimentação, a passagem de novas regulamentações de segurança de alimentos e a redução no número de patógenos presentes nos matadouros (THAKUR; BAJAJ, 2006).

Tal fato pode ser exemplificado por Aarestrup (1999), ao descrever que depois de uma grande epidemia de *Salmonella* Typhimurium DT29 resistentes no Reino Unido em 1963-1965, constou no Comitê Swann a recomendação que somente os antimicrobianos que têm pouca ou nenhuma aplicação como agentes terapêuticos em humanos e outros animais e que não prejudiquem a eficácia de uma prescrição terapêutica de antimicrobianos através do desenvolvimento de resistência, deve ser usado para a promoção de crescimento e que os antimicrobianos terapêuticos só devem estar disponíveis para utilização em animais, se prescritos por um médico veterinário.

### **2.11.3 Mecanismo de resistência**

Segundo Witte (2004), o aumento de resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos pode ocorrer pela transferência vertical ou horizontal de genes de resistência. Contudo, Fluit (2005) e Fluit e Schmitz (2004) relataram que a resistência aos antimicrobianos pode ocorrer a partir de mutações e de aquisição de genes que codificam resistência. Os integrons estão associados a multirresistência e *Salmonella* spp. multirresistentes são uma ameaça para o

tratamento das infecções causadas por estes microrganismos. Integrons são elementos que contêm os determinantes genéticos dos componentes de um sistema de recombinação específica do local que reconhece e captura o cassete do gene celular. Um integron contém o gene para uma integrase e um local de recombinação adjacente. Cassetes de genes não são necessariamente parte do integron, mas uma vez integrados fazem parte do integron. Dois grupos de integrons podem ser discernidos: integrons de resistência e super-integrons. Quase todas os cassetes de genes conhecidos a partir de integrons de resistência codificam resistência aos antimicrobianos ou desinfetantes. Estes integrons foram encontrados em transposons, plasmídeos e no cromossoma bacteriano. Cassetes gênicos em super-integrons codificam uma variedade de diferentes funções. Os super-integrons estão localizados no cromossoma bacteriano.

De uma forma mais simples Witte (2004) explicou que basicamente a resistência aos antimicrobianos em bactérias pode ser disseminada por duas formas: propagação de linhagens clonais de resistência e transferência horizontal de genes de resistência. Contudo, o autor explica que a implícita difusão da variedade de uma linhagem especial resistente aos antimicrobianos com base na formação cromossômica deve ser interpretada com cautela, pois a possibilidade de que os genes de resistência poderiam ter sido adquiridos e as mutações de resistência poderiam ter surgidas em tempos diferentes e em locais diferentes, devem ser levados em consideração. Ainda para Witte (2004), na maioria dos casos, os genes de resistência são integrados em elementos transferíveis tais como integrons, transposons e ainda grandes grupos de genes de resistência e cassetes cromossômicos de genes.

O aparecimento de sorotipos multirresistentes de *Salmonella* spp. tornou-se uma preocupação mundial, pois a resistência antimicrobiana a estes patógenos pode contribuir para a virulência destes microrganismos. Os determinantes de resistência e de virulência podem estar localizados no cromossoma bacteriano, em transposons ou em plasmídeos, agrupados em ilhas de resistência ou de patogenicidade e transferidos por elementos genéticos móveis ou fagos (RYCHLIK et al., 2006; WANNAPRASAT et al., 2011). Sendo assim, a presença de ambos os determinantes no transposon ou mesmo no plasmídeo, pode ser selecionado pela pressão antimicrobiana resultando em cepas de *Salmonella* spp. mais virulentas e resistentes aos antimicrobianos (WANNAPRASAT et al., 2011). Pois Hur et al. (2012) e Sefton (2002),

esclareceram que o desenvolvimento de resistência em *Salmonella* spp. aos agentes antimicrobianos é atribuível a diferentes mecanismos tais como a produção de enzimas que inativam agentes antimicrobianos através da degradação ou modificação estrutural, redução da permeabilidade celular bacteriana aos antibióticos, ativação das bombas de efluxo antimicrobianos e modificação de alvos de fármacos celulares.

## 2.12 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A determinação do perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos de salmonelas isoladas de alimentos em determinada região, além de ser importante como marcador epidemiológico, serve para orientar procedimentos terapêuticos em medicina humana e veterinária (BAÚ et al., 2001). Além disso, Thakur e Bajaj (2006), afirmaram que devido à natureza ubíqua do microrganismo, a sua patogenicidade e o aumento alarmante da resistência aos antimicrobianos, torna-se essencial a identificação de cepas resistentes para estudos epidemiológicos.

### 2.12.1 Método de difusão em disco

O método mais amplamente utilizado consiste no teste de difusão em disco. Um disco de papel de filtro contendo determinada concentração de antimicrobiano é colocado sobre a superfície de um meio sólido cuja superfície foi inoculada com o microrganismo teste. Após a incubação, o diâmetro da zona de inibição ao redor do disco é utilizado como medida do poder inibidor do antimicrobiano contra o microrganismo testado (BAUER et al., 1966; JAWETZ et al., 2005).

O método da difusão do disco proporciona a avaliação qualitativa da sensibilidade, caracterizando os microrganismos testados em sensíveis, intermediários ou resistentes aos antimicrobianos testadas. Para a realização destes testes, discos comerciais de papel de filtro impregnados com quantidades específicas dos diversos antimicrobianos são aplicados sobre a superfície de uma placa de Ágar de Müller-Hinton previamente semeada com o inóculo padronizado do microrganismo a ser testado. O antimicrobiano presente nos discos se difunde no meio de cultura, de modo que a concentração do

antimicrobiano decresce à medida que se distancia do disco, formando-se assim uma espécie de gradiente de concentração do antimicrobiano ao redor dos discos. Conjuntamente com a difusão do antimicrobiano, o microrganismo inoculado na superfície deste meio de cultura e que não é inibido pela concentração do antimicrobiano continua a se multiplicar de modo que seu crescimento torna-se visível. Nas áreas onde a concentração do antimicrobiano é inibitória, não ocorre crescimento do microrganismo, formando-se, então, uma zona ou halo de inibição ao redor dos discos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Este método é baseado na presença de um halo de inibição, considerando o tamanho do halo. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de disco-difusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionados às Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos ("The National Committee for Clinical Laboratory Standards" – NCCLS, 2003).

O método de difusão dos discos apresenta como principais vantagens: simplicidade de execução, boa reprodutibilidade, baixo custo, não necessidade de equipamento especial, além de proporcionar resultados qualitativos de fácil interpretação pelos clínicos e ótima flexibilidade para seleção dos antimicrobianos a serem testados (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

### **2.12.2 Meio de Ágar Müller-Hinton**

Segundo o NCCLS (2003), o Ágar de Müller-Hinton é considerado o melhor para testes rotineiros de sensibilidade contra bactérias, pelas seguintes razões: (i) reprodutibilidade aceitável entre os diferentes lotes nos testes de sensibilidade; (ii) contém baixo teor de inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina; (iii) crescimento satisfatório dos patógenos não fastidiosas; e (iv) existe um grande acervo de dados e experiência relativos a testes de sensibilidade realizados com esse meio.

### **2.12.3 Discos de antimicrobianos**

Os discos de antimicrobianos preparados comercialmente devem ser conservados refrigerados (2°C a 8°C) ou congelados e utilizados dentro da

validade comercial. Antes de serem utilizados, deve-se deixá-los a temperatura ambiente por cerca de duas horas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O uso de um único disco para cada antimicrobiano com cuidadosa padronização das condições do teste permite estabelecer a sensibilidade ou a resistência de determinado microrganismo ao comparar o tamanho da zona de inibição com um padrão do mesmo fármaco (JAWETZ et al., 2005).

#### **2.12.4 Preparação do inóculo; inoculação das placas e colocação dos discos**

O inóculo é preparado após o crescimento bacteriano em meio líquido e incubado por poucas horas até a turvação deste. Alternativamente, quatro ou cinco UFC de crescimento bacteriano puro podem ser diretamente suspensas em caldo ou solução salina. Este caldo deve apresentar uma concentração bacteriana de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL. Para o inóculo bacteriano recomenda-se a utilização da escala 0,5 de McFarland (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Em condições ideais, mergulha-se um suabe de algodão estéril na suspensão ajustada, até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O suabe deve ser girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. Isso ajudará a retirar qualquer excesso de inóculo no suabe. A superfície seca da placa de Ágar Müller-Hinton é inoculada esfregando o suabe em toda a superfície estéril do Ágar. Repete-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passa-se um suabe na margem da placa do Ágar. A tampa pode ser deixada entreaberta de três a cinco minutos, embora nunca mais de 15 minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de umidade seja absorvido antes de se aplicar os discos impregnados de droga (NCCLS, 2003).

Um conjunto predeterminado de discos antimicrobianos é colocado na superfície da placa de Ágar semeada. Cada disco deve ser pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície de Ágar. Independentemente de serem aplicados individualmente ou com dispensador, os discos devem ser distribuídos por igual, de maneira que a distância de centro para centro de cada disco não exceda 24 mm. Em geral, deve-se colocar 12 discos, no máximo, numa placa de 150 mm, ou cinco discos



numa placa de 100 mm. Uma vez que alguns antimicrobianos se difundem quase instantaneamente, o disco não deve ser reaplicado após ter entrado em contato com a superfície de Ágar. Em vez disso, coloque um novo disco em outra parte da placa. As placas são invertidas e incubadas em estufa a 35°C/16-18 horas em atmosfera ambiente, até 15 minutos após a aplicação dos discos. Após a incubação, procede-se a leitura dos halos de inibição (NCCLS, 2003; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Para a correta realização deste teste de sensibilidade aos antimicrobianos, deve-se ter um rígido controle de qualidade envolvendo todos os procedimentos, inclusive quantidade do meio de cultura nas placas, pH 7,2 a 7,4, estocagem das placas em condições apropriadas, temperatura de incubação, teste com cepas-padrão para controle do meio e de discos, entre outros (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

#### **2.12.5 Interpretação dos resultados**

Após 16-18 horas de incubação, examina-se cada placa. Se a placa foi satisfatoriamente semeada, e o inóculo correto, os halos de inibição resultantes serão uniformemente circulares e haverá um tapete confluyente de crescimento. Se colônias individuais forem aparentes, o inóculo demasiadamente leve, o teste deverá ser repetido. Os diâmetros dos halos de inibição total (julgados a olho nu) são mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Os halos são medidos em milímetros usando um halômetro, um paquímetro ou uma régua, que é encostado na parte de trás da placa de Petri invertida (NCCLS, 2003).

Jawetz et al. (2005), afirmaram que os tamanhos das zonas de inibição do crescimento variam de acordo com as características moleculares dos diferentes antimicrobianos. Assim, o tamanho da zona de um antimicrobiano não pode ser comparado ao da zona de outro antimicrobiano que atua sobre o mesmo microrganismo. Entretanto, para qualquer antimicrobiano, o tamanho da zona pode ser comparado com um padrão, contanto que o meio de cultura, a concentração do inóculo e outras condições sejam cuidadosamente controlados. Isto permite definir, para cada fármaco, o diâmetro mínimo da zona de inibição que indica a suscetibilidade de determinado microrganismo isolado pela técnica de difusão simples em disco.

Os resultados dos testes de avaliação de sensibilidade aos antimicrobianos, podem ser divididos em três categorias ("Clinical and Laboratory Standards Institute" – CLSI, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008):

a) **Sensível:** significa que a infecção devida ao microrganismo estudado pode ser adequadamente tratada com a dosagem de agente antimicrobiano testado e recomendado para este tipo de infecção e espécie infectante, exceto quando contra-indicado;

b) **Intermediário:** inclui isolados com CIM do agente antimicrobiano que se aproximam de níveis sanguíneos e tissulares atingíveis e para os quais as taxas de resposta podem ser inferiores àquelas para isolados sensíveis. Esta categoria implica eficácia clínica nos sítios corpóreos de concentração fisiológica dos antimicrobianos ou quando é possível usar uma dose do antimicrobiano maior que a normal. Isto significa que o microrganismo pode ser inibido por concentrações atingíveis de certos antimicrobianos se doses maiores puderem ser administradas ou se a infecção ocorre em local onde o antimicrobiano alcança fisiologicamente maiores quantidades;

c) **Resistente:** quando o isolado não é inibido pela concentração do antimicrobiano obtida no local da infecção ou quando o microrganismo patogênico apresenta mecanismos específicos de resistência.

### **3 DESENVOLVIMENTO**

Nesta seção encontram-se descritas a demonstração e explicação das metodologias utilizadas, e todos os resultados encontrados e analisados com as respectivas discussões sobre o tema.

Ao final desta seção também são apresentados os sete artigos que foram produzidos, a partir dos resultados apresentados. Todos os artigos foram enviados para diferentes revistas científicas com corpos editoriais relacionados ao tema do trabalho.

#### **3.1 METODOLOGIA**

##### **3.1.1 Local; área do estudo e coletas de amostras**

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal e no Laboratório de Epidemiologia Molecular, ambos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), onde foram analisadas 80 amostras de hambúrgueres, sendo 40 de carne bovina e 40 mistos (carne bovina e carne de frango), adquiridas no comércio formal (supermercados e/ou açougues) do município de Niterói-RJ, no período de maio a dezembro de 2011.

Os hambúrgueres encontravam-se embalados individualmente em cartuchos de polipropileno duplos ou simples, com peso individual variando de 56 g a 120 g. Estes foram adquiridos através de compra direta nos estabelecimentos comerciais, sendo a aquisição do produto feita de forma aleatória. As amostras foram coletadas na própria embalagem original sendo armazenadas individualmente em sacos de polietileno de baixa densidade com fecho hermético, mantidas em recipiente isotérmico portátil, com gelo, até a chegada ao Laboratório, onde foram realizadas as análises. Um conjunto de quatro hambúrgueres foi considerado uma unidade de amostra.

##### **3.1.2 Temperatura dos balcões de exposição e dos hambúrgueres**

Durante a aquisição dos hambúrgueres, no comércio formal, foi mensurada a temperatura dos balcões frigoríficos de exposição e a temperatura

dos hambúrgueres adquiridos no momento da compra, utilizando um termômetro digital com laser infravermelho (Suryha®).

### 3.1.3 Análises laboratoriais

As amostras de hambúrgueres bovino e misto foram usadas para as diferentes análises laboratoriais de isolamento e identificação da *Salmonella* spp., através da microbiologia convencional, o método Salmosyst (ambos modificados) e a reação em cadeia da polimerase, além da contagem padrão de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (FIGURA 2).

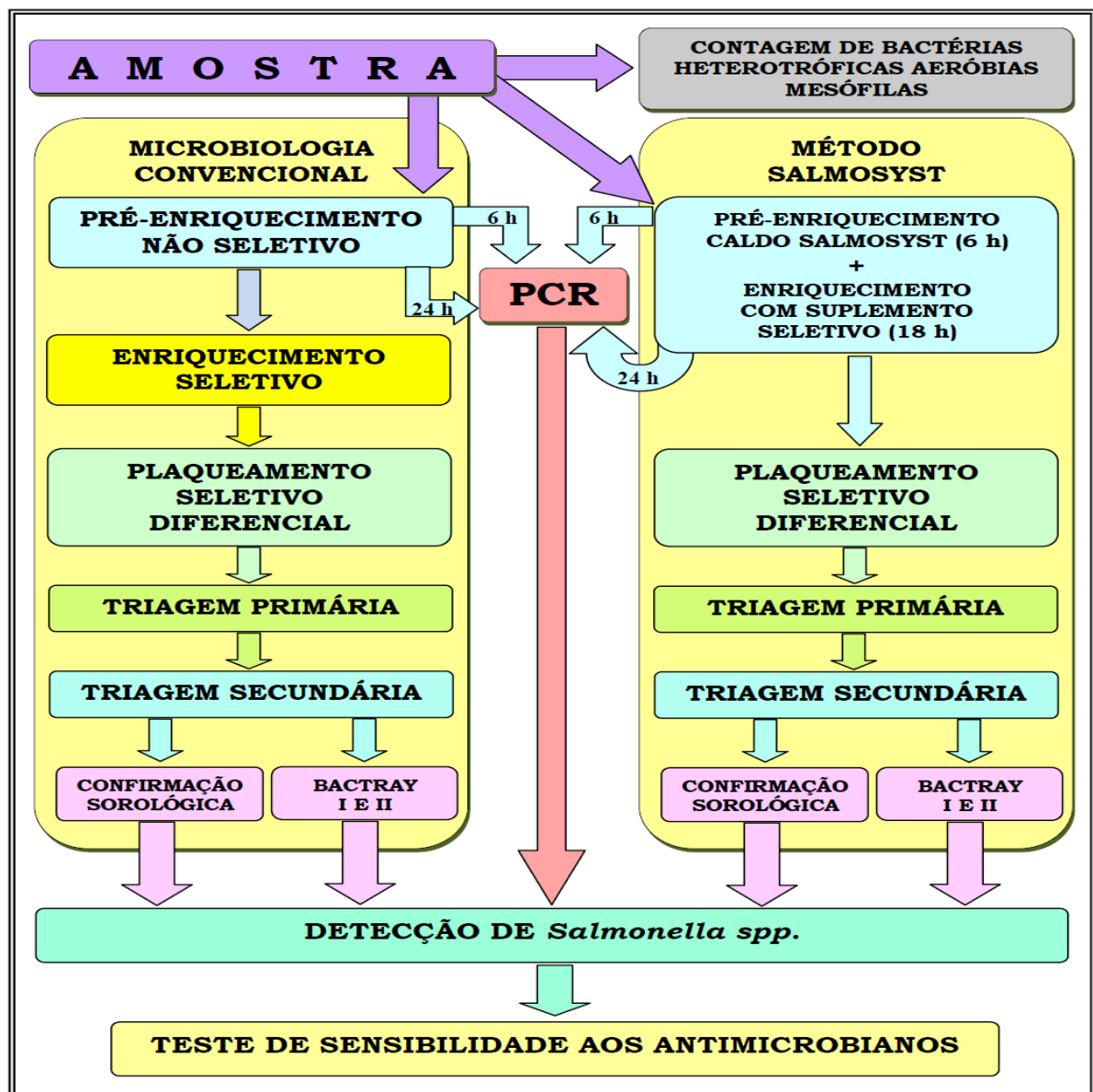


FIGURA 2. Esquema geral das análises laboratoriais para detecção de *Salmonella* spp.

### 3.1.3.1 Preparo do material e dos meios de cultura

A vidraria utilizada no experimento foi previamente esterilizada em estufa a 170°C por duas horas. As soluções, reagentes, meios de cultura e materiais descartáveis foram preparados conforme suas especificações e em quantidades suficientes para o uso semanal. A eficácia da esterilização em autoclave foi monitorada através da fita indicadora de autoclavagem. A fita foi colocada em todo material que foi esterilizado a 121°C por 15 minutos e, após a esterilização do material indicava que o material havia sido esterilizado.

### 3.1.4 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas

#### 3.1.4.1 Diluições seriais decimais

De cada amostra (composta de um conjunto de quatro hambúrgueres), utilizando-se balança digital de precisão, foi retirada uma alíquota de 25 g, com o auxílio de espátula de aço inoxidável esterilizada, e colocada em saco para homogeneização e depois adicionado 225 mL de Água Peptonada (AP) sendo, em seguida, homogeneizada por 60 segundos no "Stomacher" em velocidade normal, obtendo assim a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, após homogeneização, com auxílio de uma micropipeta transferiu-se 1,0 mL desta solução  $10^{-1}$  para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de AP, obtendo assim a diluição  $10^{-2}$  e a partir desta diluição utilizando-se o mesmo procedimento, obteve-se a diluição de  $10^{-3}$ . Estas diluições foram usadas para a contagem padrão em placas de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, conforme a descrição a seguir.

#### 3.1.4.2 Método de contagem padrão de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em placas

A partir das diluições em Água Peptonada (AP) transferiram-se alíquotas de 1,0 mL em uma placa de Petri para cada diluição ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ), respectivamente, onde verteu-se de 20 mL do meio Ágar Padrão para Contagem (APC) – método de semeadura em profundidade ("pour plate"). Após a homogeneização, e solidificação do meio, as placas foram incubadas, em posição invertida, em estufa com temperatura de 35°C por 24 a 48 horas para a

contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM) (SILVA et al., 2007; SIQUEIRA, 1995).

O método de CBHAM em placas é a técnica mais utilizada na determinação do tamanho de uma população bacteriana. Neste método considera-se, na sua aplicação, três princípios: cada colônia é originada do crescimento e da multiplicação de uma bactéria; o inóculo original é sempre homogêneo; e não existe agregação das células. Na realização do método de contagem em placa é essencial que somente um número limitado de colônias cresça em cada placa. No método "pour plate" o inóculo foi realizado com um volume de 1,0 mL da diluição bacteriana diretamente na placa de Petri. O meio nutriente foi mantido em banho-maria entre 45°C e 50°C para impedir a solidificação do Ágar, para que fosse vertido sobre a amostra, que foi homogeneizada através de agitação suave da placa. Após a solidificação do Ágar as placas foram incubadas na temperatura de crescimento da bactéria. Esta metodologia permitiu o crescimento das colônias dentro do Ágar Padrão para Contagem (APC) (TORTORA et al., 2012).

Madigan et al. (2010) relataram que nas técnicas de semeadura em profundidade ("pour plate"), é importante que o número das colônias desenvolvidas nas placas não seja muito grande, porque, em placas muito populosas, algumas células podem não formar colônias ou estas podem fundir-se, levando a erros de contagem. Também é essencial que o número de colônias não seja muito pequeno, pois poderá comprometer a significância estatística da contagem. Normalmente, na prática, são contadas apenas placas que possuam entre 30 e 300 Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

### **3.1.5 Pesquisa de *Salmonella* spp.**

O método convencional empregado para as análises microbiológicas de isolamento e identificação de *Salmonella* spp. foi baseado na Instrução Normativa (IN) nº 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), na qual são oficializados os métodos analíticos para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água (BRASIL, 2003).

Os resultados das análises de pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres, tanto de carne bovina quanto mistos (carne bovina e carne de

frango), foram comparados com o padrão nacional, baseado na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, do Ministério da Saúde (MS); Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), onde consta os padrões microbiológicos sanitários para alimentos e são determinados os critérios para a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2001).

As análises da reação em cadeia da polimerase foram realizadas baseando-se em protocolos descritos por Flôres et al. (2001), Santos et al. (2001a) e Santos et al. (2001b), onde a extração de DNA foi realizada por tratamento térmico.

### 3.1.5.1 Microbiologia convencional

#### *3.1.5.1.1 Pré-enriquecimento*

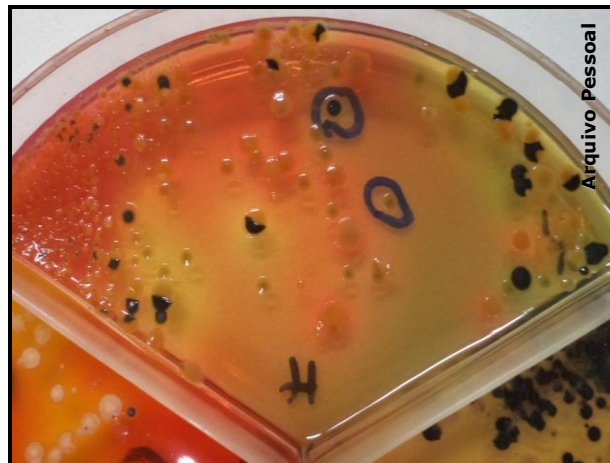
Foi pesada, em balança digital de precisão, e em saco para homogeneização, 25 g da amostra na qual foi adicionada 225 mL de Solução Salina Peptonada Tamponada 1% (SSPT). Após, foi homogeneizado por 60 segundos no "Stomacher" em velocidade normal. Fechou-se hermeticamente o saco contendo a amostra e a SSPT e deixou-se em repouso por uma hora em temperatura ambiente antes de ser colocado em estufa a temperatura de 36°C por 16 a 20 horas (BRASIL, 2003).

#### *3.1.5.1.2 Enriquecimento*

A partir do procedimento do pré-enriquecimento, foi inoculado, simultaneamente de cada amostra, nos meios líquidos seletivos, Caldo Selenito Cistina (SC) e Caldo Tetrionato (TT). Utilizando-se pipetas esterilizadas foram transferidas alíquotas de 1,0 mL para tubo contendo 10,0 mL de Caldo SC e 1,0 mL para tubo contendo 10,0 mL de Caldo TT. Todos foram incubados em banho-maria a 41°C por 24 a 30 horas (BRASIL, 2003).

### 3.1.5.1.3 Plaqueamento seletivo

A partir dos caldos seletivos de enriquecimento, repicou-se sobre a superfície previamente seca de placas de Petri com cada meio sólido seletivo de escolha, estriando de forma a se obter colônias isoladas com o auxílio de alça bacteriológica. Foram obtidas duas placas para cada meio de cultura de escolha, uma originária do Caldo SC e outra do Caldo TT. Os meios sólidos escolhidos foram: Ágar Hektoen (HE) (**FIGURA 3**); Ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (**FIGURA 4**); Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (**FIGURA 5**) e Ágar *Salmonella* Diferencial (ASD) (**FIGURA 6**). Todos os meios foram incubados em estufa bacteriológica a 36°C por 18 a 24 horas (BRASIL, 2003).

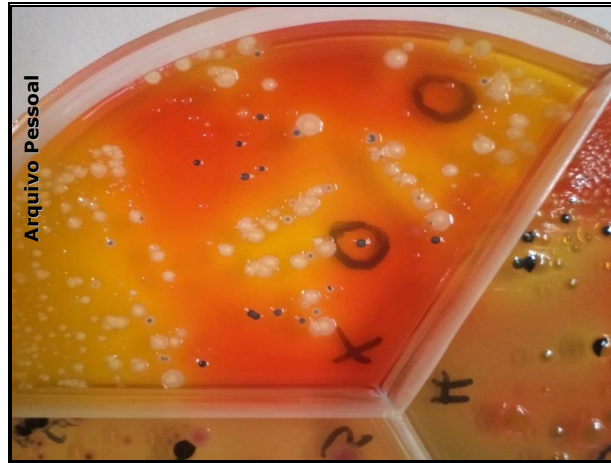


**FIGURA 3.** Ágar Hektoen (HE) contendo colônias típicas de *Salmonella* spp. – cor azul-esverdeada (verde-azulado) com ou sem precipitado preto (produção de H<sub>2</sub>S).



**FIGURA 4.** Ágar *Salmonella-Shigella* (SS) contendo colônias típicas de *Salmonella* spp. – colônias incolores com ou sem precipitado preto (produção de H<sub>2</sub>S).





**FIGURA 5.** Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) contendo colônias típicas de *Salmonella* spp. – colônias translúcidas com ou sem precipitado preto (H<sub>2</sub>S) e acidez do meio (amarelo). Colônias com cor laranja suspeitas de *Salmonella* Typhi.



**FIGURA 6.** Ágar *Salmonella* Diferencial (ASD) contendo colônias típicas de *Salmonella* spp. – cor vermelha ou rosa, indicando produção do Ácido Glicolpropileno.

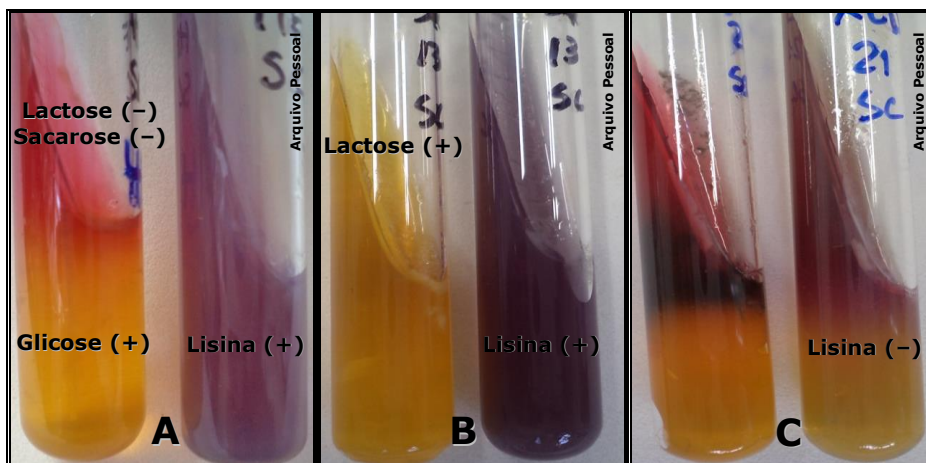
#### 3.1.5.1.4 Triagem primária (identificação bioquímica)

Foram escolhidas até três colônias típicas de cada placa de Petri do plaqueamento seletivo, que foram repicadas para tubos de ensaio contendo Ágar Nutriente inclinado e incubadas a 36°C por 18 a 24 horas.

De cada tubo de ensaio de Ágar Nutriente foram transferidas, com o auxílio de agulha bacteriológica, colônias típicas e isoladas para dois diferentes tubos contendo, respectivamente, Ágar Três Açúcares Ferro ("Tríplice Sugar

Iron” – TSI) e Ágar Lisina Ferro (“Lisine Iron Agar” – LIA), que foram incubados em estufa bacteriológica a 36°C por 24 a 30 horas (BRASIL, 2003).

Após o tempo de incubação foram escolhidos os respectivos pares dos tubos de TSI e LIA com leituras fenotípicas características para o gênero *Salmonella*, com ou sem produção de H<sub>2</sub>S (**FIGURA 7**). Tubos TSI/LIA típicos apresentavam-se com as seguintes características: TSI com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho) e LIA com fundo e bisel alcalino (púrpura). Tubos TSI/LIA atípicos 1: TSI com fundo e bisel ácido (amarelo) e LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura). Tubos TSI/LIA atípicos 2: TSI com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho) e LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura). Os tubos TSI/LIA que foram descartados apresentavam as seguintes características: TSI com fundo e bisel ácido (amarelo) e LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura).



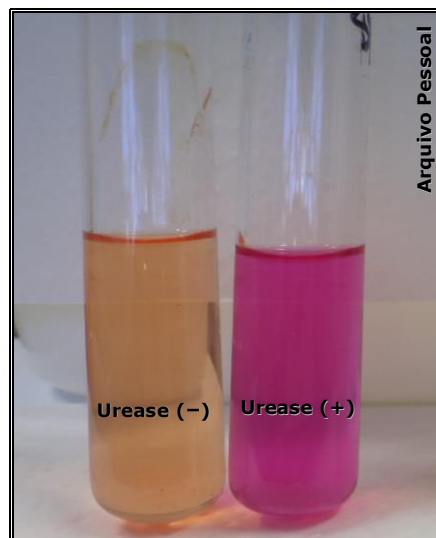
**FIGURA 7.** Triagem Primária com seus respectivos pares de tubos de TSI e LIA característicos para *Salmonella* spp. **A (TSI/LIA Típicos):** TSI com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho); LIA com fundo e bisel alcalino (púrpura). *Salmonella* spp. típica. **B (TSI/LIA Atípicos 1):** TSI com fundo e bisel ácido (amarelo); LIA com fundo e bisel alcalino (púrpura). *Salmonella* spp. atípica. **C (TSI/LIA Atípicos 2):** TSI com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho); LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura). *Salmonella* Paratyphi.

### 3.1.5.1.5 Triagem secundária (provas bioquímicas complementares)

A partir dos tubos utilizados na triagem (TSI e LIA), com leitura dos dois meios de cultura típico para *Salmonella* spp., foram repicados, utilizando a alça bacteriológica, colônias dos tubos de TSI para tubos contendo Ágar Nutriente inclinado e incubadas a 36°C por 18 a 24 horas. Depois da incubação, as colônias

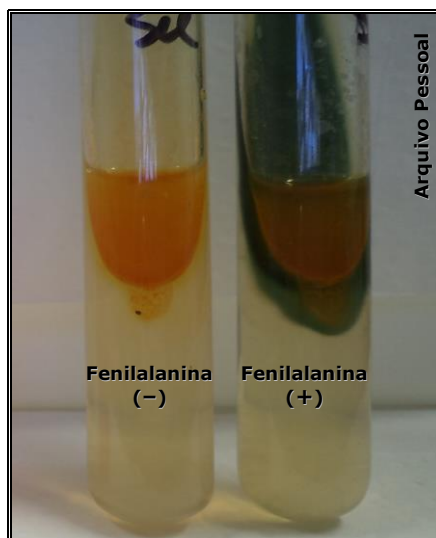
do Ágar Nutriente foram repicadas, utilizando a alça bacteriológica, transferindo colônias para tubos contendo meios de cultura que evidenciaram as propriedades fisiológicas e metabólicas das culturas suspeitas por meio da verificação da produção da Urease (Caldo Ureia) e desaminação da Fenilalanina (Ágar Fenilalanina). Esta fase tornou-se importante para que se diferenciasses células bacterianas de *Proteus* spp., que são Urease positiva (hidrolisam a Ureia) e desaminam a Fenilalanina, de células bacterianas de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2003).

Para o teste da produção da urease semeou-se maciçamente UFC em tubos de ensaio contendo 3,0 mL de Caldo Ureia e incubou-se a 36°C por 24 a 30 horas. Foi observada a coloração do meio. A manutenção da cor inicial do meio indicou que não ocorreu hidrólise da ureia. A alteração para rosa foi indicativa de alcalinização do meio devido à ação da urease sobre a ureia (**FIGURA 8**). A *Salmonella* spp. não produz a urease (BRASIL, 2003).



**FIGURA 8.** Teste da produção da urease. A *Salmonella* spp. não produz urease (-).

Para o teste da desaminação da fenilalanina inoculou-se a superfície do bisel do Ágar Fenilalanina por estriamento e incubou-se a 36°C por 18 a 24 horas. Para a leitura, foi adicionado duas a três gotas de solução de Cloreto Férrico a 10%. A alteração de coloração da cultura na superfície do bisel para verde indicou reação de desaminação da Fenilalanina (**FIGURA 9**). *Salmonella* spp. não desamina a fenilalanina (BRASIL, 2003).



**FIGURA 9.** Teste da desaminação da fenilalanina. A *Salmonella* spp. não desamina a fenilalanina (-).

#### 3.1.5.1.6 Prova de soroaglutinação (sorologia)

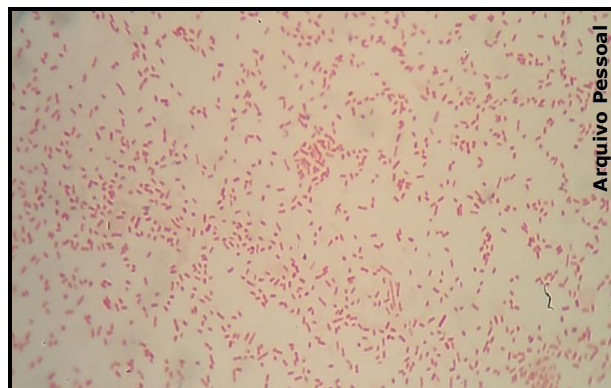
A partir dos resultados negativos do teste da produção da Urease e da desaminação da Fenilalanina, característicos de células bacterianas de *Salmonella* spp., foram repicadas colônias dos tubos de TSI correspondentes para Ágar Nutriente inclinado e incubadas a 36°C por 18-24 horas, para a prova de soroaglutinação (sorologia). Foi ressuspendido o cultivo obtido em Ágar Nutriente inclinado em aproximadamente 2,0 mL de Solução Salina 0,85%. Em lâmina de vidro foi depositado separadamente uma gota de Solução Salina 2% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente (Probac®), diretamente do frasco. Este soro contém anticorpos contra os antígenos O dos grupos A, B, C, D e E, contra o antígeno Vi e também contra os antígenos flagelares H a, b, c, d, i, 1, 2, 5. Em seguida, acrescentou-se a cada uma delas uma gota da suspensão teste. Com movimentos circulares, realizou-se a leitura com iluminação sobre o fundo escuro em um a dois minutos, classificando a reação do seguinte modo: positiva (presença de aglutinação somente na mistura cultivo mais antissoro) (**FIGURA 10**); negativa (ausência de aglutinação em ambas as misturas); e não específica (presença de aglutinação em ambas as misturas) (BRASIL, 2003).



**FIGURA 10.** Soroaglutinação positiva (presença de aglutinação) para *Salmonella* spp.

#### 3.1.5.1.7 Características morfológicas

Em cada etapa das análises microbiológicas (método convencional e método Salmosyst), foram transferidas alçadas dos caldos, além das colônias das placas e tubos, para uma lâmina de vidro para a realização de esfregaço corado pelo método de Gram, para a observação de bastonetes Gram-negativos (**FIGURA 11**), utilizando-se um microscópio óptico com objetiva de imersão.



**FIGURA 11.** Microfotografia de bastonetes Gram-negativos, típicos de *Salmonella* spp., observados utilizando-se um microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000X).

#### 3.1.5.2 Sistema Bactray® I e II

Para a identificação de *Salmonella* spp. utilizou-se o sistema comercial Bactray® I e II, indicado para bacilos Gram-negativos fermentadores e oxidase

negativa. Os procedimentos foram realizados conforme recomendações do fabricante.

A partir dos tubos de TSI da triagem primária, que foram característicos para *Salmonella* spp. e confirmados na prova de soroaaglutinação, transferiu-se para tubos contendo Ágar Nutriente inclinado, com auxílio de alça bacteriológica, e incubados a 36°C por 18 a 24 horas. Após incubação, foi suspensa em água destilada esterilizada até a turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Desta suspensão foi transferido 1,0 mL para o conjunto de análise Bactray® I, distribuindo o volume entre os compartimentos que contém os reagentes desidratados para realização das provas de: hidrólise da  $\beta$ -galactosidase (ONPG) e da arginina (ADH); descarboxilação da lisina (LDC) e da ornitina (ODC), produção de ácido sulfídrico ( $H_2S$ ), indol (IND) e urease (URE); utilização da glicose e produção de acetoina (VP1), desaminação da fenilalanina (PD); e utilização do citrato como única fonte de carbono (CIT); e 1,0 mL para o conjunto de análise Bactray® II, que é considerado complementar ao Bactray® I, para a realização das provas de: utilização do malonato, ramnose, adonitol, salicina, arabinose, inositol, manitol e rafinose. O óleo mineral esterilizado foi adicionado as provas de ADH, LDC, ODC,  $H_2S$  e URE e os conjuntos foram incubados a 36°C por 24 horas.

Após a incubação foi adicionado os reagentes ( $\alpha$ -naftol e hidróxido de potássio no VP, cloreto férrico no PD e reativo de Kovac's no IND) para a realização da leitura por meio da mudança de cor nos compartimentos. Os dados foram adicionados a uma planilha eletrônica componente do conjunto de análise. A identificação da espécie foi realizada pelo programa eletrônico ("software").

#### 3.1.5.3 Método Salmosyst

Foi pesada, em balança digital de precisão, e em saco para homogeneização, 25 g da amostra na qual foi adicionada 225 mL de Caldo Base Salmosyst para Pré-enriquecimento (CBSY). Após, foi homogeneizado por 60 segundos no "Stomacher" em velocidade normal. Fechou-se hermeticamente o saco contendo a amostra e a CBSY e deixou-se em repouso por uma hora em temperatura ambiente antes de ser colocado em estufa a temperatura de 35°C por seis horas. Para o enriquecimento seletivo Salmosyst, transferiu-se 10,0 mL do CBSY para tubos de ensaio contendo 1,0 mL do Suplemento Seletivo,

tornando-se um Caldo Seletivo, e incubou-se a 35°C por 18 horas. Após a incubação, estriou-se uma alçada deste Caldo Seletivo em placas com Ágar *Salmonella* Diferencial (ASD), incubando-as a 35°C por 18 horas (PIGNATO et al., 1995). As colônias rosas ou vermelhas foram submetidas a identificação bioquímica (triagem primária e secundária), sorologia e sistema Bactray®, tal como descrito na metodologia convencional.

#### 3.1.5.4 Reação em cadeia da polimerase

As análises da PCR, das amostras, foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF).

A partir do Caldo de pré-enriquecimento (SSPT), utilizado na microbiologia convencional, foi transferida uma alíquota de 0,7 mL nos tempos seis horas e 24 horas de incubação, para diferentes microtubos de polipropileno (tipo "Eppendorf") esterilizados, para a realização da extração do DNA e em seguida a amplificação deste DNA, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase.

Para o método Salmosyst as alíquotas de 0,7 mL foram transferidas para diferentes microtubos de polipropileno (tipo "Eppendorf") esterilizados, a partir do Caldo Base Salmosyst para Pré-enriquecimento (CBSY) no tempo seis horas e do Caldo Seletivo com o Suplemento Seletivo no tempo 24 horas.

Adicionou-se 0,7 mL de glicerol esterilizado aos respectivos microtubos de polipropileno para que estes fossem estocados a -20°C até o momento da extração e amplificação do DNA.

##### 3.1.5.4.1 Protocolo da reação em cadeia da polimerase

O protocolo utilizado foi baseado de acordo com Flôres et al. (2001), Santos et al. (2001a) e Santos et al. (2001b), onde a extração de DNA foi realizada por tratamento térmico.

Utilizou-se um par de "primer" que amplifica 284 pares de base (pb), com a sequência de oligonucleotídeos derivada do gen *invA* (RAHN et al., 1992; VON RÜCKERT et al., 2006): Primer 1 (*invA* 159: 5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3') e Primer 2 (*invA* 141: 5' TCA TCG CAC ACG TCA AAG GAC C 3').

#### 3.1.5.4.1.1 Extração do DNA

De cada uma das amostras provenientes dos respectivos caldos de pré-enriquecimento (microbiologia convencional) e caldos de enriquecimento (método Salmosyst), acondicionadas anteriormente em microtubos de polipropileno (tipo "Eppendorf"), foram retiradas alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  (com o auxílio de micropipetas com ponteiras) e transferidas para novos microtubos onde foram acrescentados igual volume (300  $\mu\text{L}$ ) de solução Tampão TE (Tris-EDTA). Homogeneizou-se por 30 segundos em agitador automático de tubos e logo em seguida os microtubos foram centrifugados durante 30 minutos a 13.500 rpm a 10°C. Descartou-se o sobrenadante (com o auxílio de micropipeta e ponteiras) e utilizou-se aproximadamente 50  $\mu\text{L}$  do sedimento. Adicionou-se mais 100  $\mu\text{L}$  de solução Tampão TE (Tris-EDTA) e homogeneizou-se por dez segundos em agitador automático de tubos. Após a homogeneização os microtubos foram mantidos por dez minutos em bloco térmico a 94°C e imediatamente foram transferidos para a centrifugação durante um minuto a 13.500 rpm a 10°C. Com o auxílio de micropipeta e ponteiras, transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos onde logo depois estes foram levados ao congelador a uma temperatura de -20°C por 10 minutos antes da fase de amplificação.

#### 3.1.5.4.1.2 Amplificação do DNA

As reações de PCR foram realizadas em microtubo cônico de polipropileno de 200  $\mu\text{L}$ , onde foram adicionados (com o auxílio de micropipeta e ponteiras) 4,4  $\mu\text{L}$  água ultra pura; 5,0  $\mu\text{L}$  de Tampão 10X; 5,0  $\mu\text{L}$  (50 mM) de  $\text{MgCl}_2$  (cloreto de magnésio); 5,0  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (25  $\mu\text{M}$  de cada nucleotídeo); 1,0  $\mu\text{L}$  (100  $\rho\text{mol}$ ) do Primer 1 (*invA* 159: 5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3'); 1,0  $\mu\text{L}$  (100  $\rho\text{mol}$ ) do Primer 2 (*invA* 141: 5' TCA TCG CAC ACG TCA AAG GAC C 3'); 1,2  $\mu\text{L}$  de BSA (Albumina de Soro Bovino) (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 0,4  $\mu\text{L}$  da *Taq* DNA polimerase (2,0 U) e 2,0  $\mu\text{L}$  da amostra (DNA purificado) gerando um volume final de 25,0  $\mu\text{L}$ . Como controle positivo foi utilizado 2,0  $\mu\text{L}$  de amostra DNA de *Salmonella* Enteritidis e como controle negativo 2,0  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. As condições de amplificação no termociclador foram: um ciclo de cinco minutos a 94°C (desnaturação); 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 54°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão); e um ciclo



de extensão final de sete minutos a 72°C. Após a amplificação por PCR, o produto total da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE (Tris Borato EDTA) 0,5X corado com 5,5 mg/mL de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram visualizados em transluminador ultravioleta e fotodocumentados.

### **3.1.6 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**

Foi utilizado o método de difusão em disco, que foi baseado na presença ou ausência de um halo de inibição, de acordo com o "The National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS, 2003) e "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI, 2005).

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado utilizando discos (Polisensidisc®) impregnados com as seguintes drogas antimicrobianas, com suas respectivas concentrações: amicacina (30 µg); gentamicina (10 µg); ampicilina (10 µg); aztreonam (30 µg); cefalotina (30 µg); cefotaxina (30 µg); cefoxitina (30 µg); ceftazidima (30 µg); ceftriaxona (30 µg); cloranfenicol (30 µg); sulfazotrim (25 µg) e tetraciclina (30 µg).

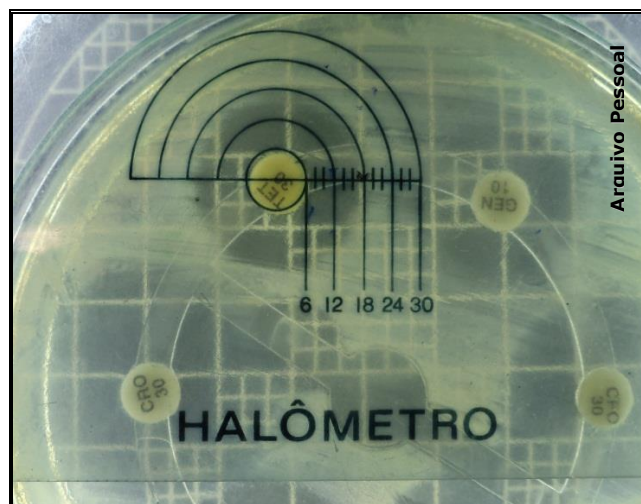
A partir de colônias confirmadas no isolamento e identificação de *Salmonella* spp., tanto nas análises microbiológicas convencionais, método Salmosyst e quanto nas da PCR, os isolados foram repicados (reativados) em tubos de ensaio contendo Ágar Nutriente (AN) inclinado e incubadas a 36°C por 24 horas. Após incubação adicionou-se solução salina a 0,85% ajustando-se de acordo com a escala da McFarland 0,5.

Em condições ideais, foi mergulhado um suabe de algodão estéril na suspensão ajustada, até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O suabe foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. Isso ajudou a retirar qualquer excesso de inóculo no suabe. A superfície seca da placa de Ágar Müeller-Hinton foi inoculada esfregando o suabe em toda a superfície estéril do Ágar. Repetiu-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se um suabe na margem da placa do Ágar. A tampa da placa ficou entreaberta por dez minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de

umidade seja absorvido antes de se aplicar os discos impregnados com o antimicrobiano.

Um conjunto pré-determinado de discos antimicrobianos (Polisensidisc®) foi colocado na superfície da placa de Ágar Müller-Hinton semeada. Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície do Ágar. As placas foram invertidas e incubadas em estufa a 36°C/18-20 horas em atmosfera ambiente, até 15 minutos após a aplicação dos discos.

Após a incubação, se a placa foi satisfatoriamente semeada, e o inóculo era correto, os halos de inibição (sensibilidade) resultantes encontravam-se uniformemente circulares ocorrendo um tapete confluyente de crescimento. Se as UFC individuais fossem aparentes, o inóculo era demasiado leve e o teste deveria ser repetido. Os diâmetros dos halos de inibição total (julgados a olho nu) foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Os halos foram medidos em milímetros usando um halômetro (**FIGURA 12**) ou um paquímetro ou uma régua, que foi encostado na parte de trás da placa de Petri invertida.



**FIGURA 12.** Utilização do Halômetro para medir o diâmetro do halo de inibição.

Os resultados dos testes de avaliação de sensibilidade aos antimicrobianos foram divididos em três categorias: sensível; intermediário; e resistente, em comparação aos padrões dos diâmetros dos halos de inibição para cada antimicrobiano.

### 3.1.7 Desenho analítico e análise estatística

#### 3.1.7.1 Tipo de estudo e tratamentos estatísticos

Realizou-se um estudo analítico observacional transversal, onde os dados das variáveis do estudo foram apresentados e analisados através da frequência absoluta e percentual (estudo de frequência), teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ), regressão linear e logística, teste de McNemar, testes diagnósticos, *Odds Ratio* (OR) e teste de Student (teste  $t$ ).

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico *BioEstat*® 3.0 versão 2003 (AYRES et al., 2003).

#### 3.1.7.2 Cálculo da amostragem

Para calcular o tamanho da amostragem foram tomados os seguintes parâmetros: frequência esperada de contaminação do alimento ( $p$ ) de 5,0% (0,05); erro máximo (absoluto) aceitável ( $e$ ) de 5,0% (0,05) e nível (grau) de confiança ( $Z$ ) de 95% (1,96).

Neste trabalho utilizou-se amostragem de conveniência (não-probabilística). Segundo Motta e Wagner (2003), em certas pesquisas torna-se inviável a realização de um sorteio entre todos os componentes da população-alvo, sendo que a amostra de conveniência pode representar uma solução razoável, sendo mais rápida e de menor custo.

Martins e Donaire (1990) descreveram que quando a população é muito grande, torna-se difícil a observação dos aspectos a serem estudados, de cada um dos elementos, devido ao alto custo, ao intenso trabalho e ao tempo despendido para levar a cabo exaustiva observação de todos os componentes da população e, através da observação dessa amostra, analisa-se os resultados, como se fosse toda a população, só que nesse caso sem os inconvenientes anteriormente descritos.

A determinação do tamanho mínimo da amostragem necessária para a estimativa de uma proporção empregando intervalo de confiança com um determinado grau de confiança ( $Z$ ) e para uma margem de erro absoluto ( $e$ )

resultou-se a partir da seguinte fórmula, segundo Arango (2005) e Rodrigues (2002):

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{e^2}$$

Onde:

$n$  = amostra (tamanho mínimo da amostra);

$Z$  = grau (nível) de confiança;

$p$  = estimativa preliminar da verdadeira proporção ou frequência esperada de contaminação;

$q$  =  $100-p$ ;

$e$  = margem de erro absoluto (máximo), precisão.

### 3.1.7.3 Teste do Qui-quadrado

O tratamento estatístico para as análises de significância das diferenças encontradas nos métodos comparados das análises microbiológicas (microbiologia convencional e método Salmosyst) e PCR foi realizado pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com um nível de significância de 95% ( $\alpha=0,05$ ) e 99% ( $\alpha=0,01$ ).

Segundo Motta e Wagner (2003) e Rodrigues (2002), no teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) verifica se a proporção de indivíduos com determinado atributo, em uma dada população, é estatisticamente diferente de proporção de indivíduos com o mesmo atributo, em outra população.

O teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) também foi utilizado nas análises de possíveis associações entre as seguintes variáveis: tipo de hambúrguer (carne bovina ou misto); frequência de *Salmonella* spp. e método realizado.

### 3.1.7.4 Coeficiente de correlação de Pearson e de Spearman

Nesse estudo também utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e de Spearman ( $r^2$ ) para verificar o grau de dependência entre os valores encontrados nas amostras analisadas.

Segundo Berquó et al. (1981), em pesquisas que envolvem a consideração de duas ou mais variáveis, estas são estudadas simultaneamente,

procurando-se uma possível correlação entre as variáveis, objetivando-se saber se as alterações sofridas por uma das variáveis são acompanhadas por alterações nas outras. No caso particular de duas variáveis  $X$  e  $Y$ , procura-se verificar se os aumentos (ou diminuições) em  $X$ , correspondem a aumentos (ou diminuições) em  $Y$ , ou se aumentos (ou diminuições) em  $X$  são acompanhados de diminuições (ou aumentos) em  $Y$  ou, finalmente, se os aumentos (ou diminuições) em  $X$  não estão relacionados com as alterações em  $Y$ .

Objetiva-se no estudo da correlação medir e avaliar o grau de relação entre duas variáveis aleatórias. O instrumento de medida da correlação linear é dado pelo coeficiente de correlação de Pearson, sendo que o campo de variação do coeficiente  $r$  situa-se entre  $-1$  e  $+1$ . É importante lembrar que correlação não implica em causa e efeito. Se duas variáveis têm correlação positiva, isto significa apenas que as variáveis crescem no mesmo sentido. No entanto, isso não implica a idéia de que o crescimento de uma das variáveis determina o crescimento de outra. Da mesma forma, se duas variáveis têm correlação negativa, isto significa apenas que as variáveis crescem em sentidos opostos, isto é, à medida que  $X$  cresce,  $Y$ , em média, decresce. Isto não significa que os acréscimos em uma das variáveis sejam determinados pelos decréscimos na outra. O coeficiente de correlação não necessariamente mede a relação causa-efeito entre as variáveis, apesar de que essa relação possa estar presente. Em alguns casos, a relação causa-efeito pode ser provocada por um fator oculto, isto é, uma variável não considerada na análise, ou por um conjunto de fatores ocultos (LAPPONI, 2000; TOLEDO; OVALLE, 1994; VIEIRA; HOFFMANN, 1995).

Deve-se acentuar que o valor de  $r$ , calculado em qualquer caso, mede o grau de relação correspondente ao tipo de equação que é realmente admitida. Assim, se for adotada uma equação linear, e se as expressões conduzirem a um valor de  $r$  próximo de zero, isso significa que quase não há correlação linear entre as variáveis. Entretanto, não significa que não há nenhuma correlação, porque pode realmente existir uma forte correlação não-linear entre as variáveis. Em outras palavras, o coeficiente de correlação mede a excelência do ajustamento aos dados da equação realmente considerada. A menos que haja especificação em contrário, o termo coeficiente de correlação será usado para indicar o de correlação linear (SPIEGEL, 1993).

O coeficiente de correlação de Spearman ( $r_2$ ) é uma prova não-paramétrica com a finalidade de determinar o grau de associação entre duas

variáveis, pelo menos, em nível ordinal e dispostas em postos ordenados em duas séries X e Y (AYRES et al., 2003).

Também foi determinado o valor da correlação de determinação ( $r^2$ ), que é calculado elevando-se ao quadrado o valor de  $r$  encontrado. A correlação de determinação indica a porcentagem de variação dos valores de Y em função do valor de X.

### 3.1.7.5 Regressão linear e logística

Com o objetivo de se determinar a dependência entre duas variáveis para se prever o valor de uma variável dependente (Y) a partir de uma variável independente (X) utilizou-se os testes de regressão linear simples e regressão logística simples.

No estudo de correlação procura-se verificar a magnitude e o sentido da associação que possa existir entre duas variáveis, sem haver qualquer grau de dependência de uma em relação à outra. No teste de regressão a finalidade é determinar a dependência de uma variável em relação à chamada variável independente ou preditora. A regressão linear simples é muito utilizada em pesquisas, no qual procura-se prever o valor de uma variável dependente (Y) a partir de uma variável independente (X) ou preditora, pressupondo que elas assumam modelo linear. Na regressão logística simples é testada uma variável dependente de Y e uma variável independente, sendo a variável Y binária, ou seja, assume valores 1 (positivo) e valores 0 (negativo) (AYRES et al., 2003).

De acordo com Motta e Wagner (2003), a regressão linear é um modelo matemático usado para descrever a relação entre duas variáveis com o objetivo de utilizar uma delas para se prever o valor da outra. A análise de regressão é uma técnica estatística que caracteriza a relação entre duas variáveis tomando uma dada variável que se quer prever (variável resposta ou dependente) e observando a sua variação em função de uma ou de mais variáveis (variáveis explicativas ou independentes) com as quais se quer explicar o comportamento da primeira.

Na análise de regressão objetiva-se determinar a relação existente entre o atributo de interesse dependente e o outro atributo independente, registrada concomitantemente. Sendo assim, na análise de regressão é originada, essencialmente, uma equação, cujas variáveis são as variáveis dependente e

independente e cujos coeficientes refletem a intensidade da relação entre cada variável explicativa isolada e a variável resposta. A relação entre estas variáveis é expressa por uma função matemática onde a variável dependente Y é uma função da variável independente X (MOTTA; WAGNER, 2003).

#### 3.1.7.6 Teste de McNemar

A fim de se comprovar a existência da concordância dos resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres, através dos métodos utilizados, realizou-se o teste de McNemar.

O teste de McNemar é a alternativa para o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para amostras dependentes (pareadas). Sendo empregado quando é realizado um pareamento indivíduo a indivíduo entre os membros de duas amostras ou quando o indivíduo é controle de si mesmo (MOTTA; WAGNER, 2003). Neste caso, em vez de se tentar provar a discordância, tenta-se provar a concordância. Assim, o teste de McNemar apresenta também um meio de decidir se existe relação entre os fatores (no caso de amostras dependentes) ou concordância, se estiver sendo testada a reprodutibilidade de dois diagnósticos (ARANGO, 2005).

#### 3.1.7.7 Testes diagnósticos

Para se testar os níveis de sensibilidade, especificidade e precisão dos métodos (convencional e Salmosyst) de análises microbiológicas usados neste estudo, utilizou-se os testes diagnósticos.

Rodrigues (2002) descreveu que o teste diagnóstico apresenta como objetivo principal a precisão sobre o diagnóstico onde o nível de acerto deve ser o mais elevado possível, registrando positivo quando positivo e negativo quando negativo. Portanto, um diagnóstico do tipo "positivo-negativo" deve primar por apresentar uma precisão bastante acentuada. O intuito neste tipo de estudo é mostrar que há interesse em identificar um teste ou meio de diagnóstico dentre tantos, que apresente um grau de precisão considerável para o diagnóstico. Para tanto se torna necessário conhecer os seguintes conceitos: a sensibilidade é a capacidade de um teste diagnóstico identificar os verdadeiros positivos nos indivíduos verdadeiramente doentes (positivos); a especificidade é a capacidade de um teste diagnóstico identificar os verdadeiros negativos nos indivíduos

verdadeiramente sadios (negativos); e a precisão é a proporção de acertos, ou seja, o total de verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos, em relação à amostra estudada.

#### 3.1.7.8 Odds Ratio

Para se conhecer a chance de um evento acontecer, em relação ao tipo de hambúrgueres (carne bovina ou misto), no caso destes estarem contaminados por *Salmonella* spp., utilizou-se o teste de Odds Ratio (OR).

Segundo Ayres et al. (2003), o Odds Ratio (OR) é um teste para proporções dispostas em tabela de contingência 2x2, ou seja, para duas amostras dicotomizadas, mensuradas a nível nominal, o qual calcula a vantagem (ou desvantagem) de um dos eventos em relação ao outro.

#### 3.1.7.9 Teste de Student (teste *t*)

Para determinar se a porcentagem do número de cepas resistentes de *Salmonella* spp. aos agentes antimicrobianos foi diferente em relação aos tipos de hambúrgueres (bovino e misto), realizou-se o teste de Student (teste *t*).

Segundo Arango (2005) e Rodrigues (2002) este teste é o mais usado para avaliar as diferenças entre as médias de dois grupos. A aplicação do teste *t* é realizada quando se compara as médias aritméticas de duas amostras independentes, também sendo indicado quando as amostras apresentam pequeno número de elementos.

### 3.1.8 Análise de similaridade

Para a análise de similaridade (análise de agrupamento ou análise de conglomerados ou análise cladística) utilizou-se o programa *WinClada*<sup>®</sup> versão 1.00.08 (NIXON, 2002), para a geração de um cladograma, com a função de mostrar as relações de similaridade das cepas. Este cladograma representou as similaridades das cepas considerando a classificação com as categorias sensível, resistente e intermediário.

Na análise cladística foram incluídas 12 características referentes aos 12 diferentes antimicrobianos. Foi considerado a matriz de dados binária (45 cepas



X 12 antimicrobianos) em que na interseção das linhas e colunas se situou o valor da presença de cada atributo, em que por convenção designou-se 0 (zero) para cepa sensível; 1 (um) para cepa resistente e 2 (dois) para cepa intermediária.

As análises cladísticas foram realizadas no programa *WinClada*<sup>®</sup> versão 1.00.08 (NIXON, 2002) e os dendogramas foram obtidos através do programa *Nona*<sup>®</sup> versão 2 (GOLOBOFF, 1999). Os dendogramas foram obtidos em análises de parcimônia através de busca heurística, sendo que na elaboração do dendograma, utilizou-se o método de ligação simples ou método do vizinho mais próximo.

A análise de similaridade é uma técnica analítica para desenvolver subgrupos significativos de indivíduos ou objetos e consequente identificação dos grupos. Objetiva-se dividir os elementos da amostra, ou população, em grupos de forma que os elementos pertencentes a um mesmo grupo sejam similares entre si com respeito às suas variáveis (características) e os elementos em grupos diferentes sejam heterogêneos em relação a estas mesmas características (HAIR et al., 2005; MINGOTI, 2007).

## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.2.1 Pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres

De um total de 80 amostras de hambúrgueres analisadas, sendo 40 amostras de hambúrgueres de carne bovina e 40 amostras de hambúrgueres mistos (carne bovina e carne de frango), todas devidamente inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), 22 (27,5%) das amostras apresentaram-se contaminadas pelo microrganismo *Salmonella* spp., estando assim em condições sanitárias insatisfatórias e impróprias para o consumo humano, conforme preconiza a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2001).

Das 22 amostras, positivas para *Salmonella* spp., dez (12,5%) eram de hambúrgueres de carne bovina e 12 (15%) eram mistos (carne bovina e carne de frango) (**TABELA 5**).

**TABELA 5.** Número de *Salmonella* spp. detectadas nas amostras analisadas de hambúrgueres de carne bovina e misto (carne bovina e carne de frango).

Tipo de Hambúrguer	<i>Salmonella</i> spp.		<b>TOTAL</b>
	Positivo	Negativo	
Carne Bovina	10	30	<b>40</b>
Carne Bovina+Carne de Frango	12	28	<b>40</b>
<b>TOTAL</b>	<b>22 (27,5%)</b>	<b>58 (72,5%)</b>	<b>80 (100%)</b>

Em pesquisa semelhante realizada com objetivo de verificar a presença de *Salmonella* spp. em hambúrgueres de carne de peru comercializados em estabelecimentos comerciais da cidade de Niterói-RJ, Brasil, Almeida Filho et al. (2006) analisaram 30 amostras de hambúrgueres, onde 15 (50,0%) encontravam-se contaminadas. Também em pesquisa realizada com um total de 27 amostras de hambúrgueres vendidos na cidade de Maracaibo, Venezuela por Parra et al. (2002), sendo 18 de carne bovina e nove de carne de frango, nove (33,33%) hambúrgueres de carne bovina encontravam-se contaminados por *Salmonella* spp.

Já em pesquisa realizada por Leal et al. (2008), com 60 amostras de hambúrgueres, sendo 30 artesanais e 30 industriais, isolou-se *Salmonella* spp. em um (1,66%) hambúrguer, sendo este elaborado de forma artesanal.

Em trabalho experimental realizado por Ramírez et al. (2006) onde foram analisadas 81 amostras de hambúrgueres, armazenados em diferentes temperaturas (-15°C; 5°C e 15°C) e intervalos de tempo (0 h; 48 h e 96 h), somente uma (1,23%) apresentou contaminação por *Salmonella* spp. A amostra contaminada havia sido armazenada a 15°C por 96 horas, mostrando que este resultado provavelmente se deve ao binômio temperatura X tempo permitindo que a *Salmonella* spp. possa se multiplicar, caso presente no alimento, ao mesmo tempo em que ocorre diminuição da microbiota contaminante inicial, já que a *Salmonella* spp. é fraca competidora.

Outros pesquisadores realizaram análises em amostras de hambúrgueres e não evidenciaram contaminação por *Salmonella* spp. Tavares e Serafini (2003), ao verificarem a qualidade de hambúrgueres de carne bovina prontos para o consumo, comercializados em sanduicherias tipo trailers da cidade de Goiânia, Brasil, realizaram a avaliação microbiológica de 100 amostras, onde não foi detectada nenhuma espécie de *Salmonella* spp. Também Bezerra et al. (2010)

analisaram 105 amostras de hambúrgueres comercializados nas ruas de Cuiabá, Brasil, utilizando método de microbiologia convencional, sendo observado que não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras.

Em estudo realizado por Narváez et al. (2005), em uma pequena indústria de processamento de hambúrgueres em Maracaibo, Venezuela, não foi encontrada *Salmonella* spp. em 56 amostras de hambúrgueres prontos e embalados para o comércio. Entretanto, a fase de moldagem foi a que apresentou maior porcentagem de amostras positivas para *Salmonella* spp. (66,0%), seguido da fase de moagem e mistura (22,0%) e a fase onde a matéria-prima é moída (11,0%).

No presente estudo ao analisar os resultados a partir do parâmetro tipo de carne dos hambúrgueres, pode-se observar que, das 40 amostras de hambúrgueres de carne bovina, dez (25,0%) foram positivas para *Salmonella* spp. e que das 40 amostras de hambúrgueres mistos 12 (30,0%) encontravam-se contaminados pelo microrganismo *Salmonella* spp.

O teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para verificação de associação entre o tipo de carne de hambúrguer e a incidência de *Salmonella* spp. (GL=1) teve como valor calculado 0,251, com  $p=0,6165$ . Sendo menor que os valores tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (6,64) e  $\alpha=0,05$  (3,84), indicando que não houve diferença significativa entre as frequências observadas e as frequências esperadas, podendo ser atribuídos ao acaso.

Em conformidade com o teste *Odds Ratio* (OR), a probabilidade de contaminação por *Salmonella* spp. em hambúrgueres do tipo misto foi 1,29 vezes superior a dos hambúrgueres de carne bovina, com valor de  $p=0,8023$ , porém não foi estatisticamente significativo.

### **3.2.2 Métodos microbiológicos**

Para as análises microbiológicas das 80 amostras de hambúrgueres foram utilizados dois diferentes métodos: o método convencional baseado na Instrução Normativa (IN) nº 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), que oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água (BRASIL, 2003) e o método Salmosyst, segundo Pignato et al. (1995).

Das 80 amostras de hambúrgueres analisadas, através do método convencional, 17 (21,25%) apresentaram-se contaminadas por *Salmonella* spp., sendo que das 40 amostras de hambúrgueres de carne bovina, nove (22,5%) foram positivas para *Salmonella* spp. e das 40 amostras de hambúrgueres mistos, oito (20,0%) estavam contaminados por *Salmonella* spp. (**TABELA 6**).

**TABELA 6.** Número de amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp. conforme o método microbiológico utilizado e o tipo de hambúrguer.

Tipo de Hambúrguer	Método Microbiológico	
	Convencional	Salmosyst
Carne Bovina	9 (52,94%)*	3 (27,27%)
Carne Bovina+Carne de Frango	8 (47,06%)	8 (72,73%)
<b>TOTAL</b>	<b>17 (100%)</b>	<b>11 (100%)</b>

\* Porcentagens calculadas de acordo com o total de cada método utilizado.

Em 80 amostras analisadas pelo método Salmosyst, 11 (13,75%) estavam contaminados pela *Salmonella* spp., sendo que das 40 amostras de hambúrgueres de carne bovina, três (7,5%) foram positivos e das 40 amostras de hambúrgueres mistos, oito (20,0%) eram positivos para *Salmonella* spp. (**TABELA 6**).

Importante salientar que do total das 22 amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp., onze (50,0%) foram detectadas somente pelo método convencional, cinco (22,73%) somente pelo método Salmosyst e seis (27,27%) por ambos os métodos (**TABELA 7**).

**TABELA 7.** Número de amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp. de acordo com o método microbiológico utilizado, evidenciando as amostras que foram positivas em ambos os métodos.

Tipo de Hambúrguer	Método Microbiológico			<b>TOTAL</b>
	Convencional	Salmosyst	Ambos	
Carne Bovina	7	1	2	<b>10 (45,45%)</b>
Carne Bovina+Carne de Frango	4	4	4	<b>12 (54,55%)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>11 (50,0%)</b>	<b>5 (22,73%)</b>	<b>6 (27,27%)</b>	<b>22 (100%)</b>

Contrariando estes resultados, Pignato et al. (1995) realizaram análises em 519 amostras de alimentos, sendo 85 de aves, 246 de carne (bovina, suína e equina) e 188 ovos, utilizando-se o método convencional e o método Salmosyst. Das amostras analisadas detectou-se *Salmonella* spp. em 39 (7,5%) pelo método convencional e 47 (9,0%) pelo método Salmosyst. Sendo que a sensibilidade do método Salmosyst foi de 97,9% e do método convencional foi de 81,2%.

Para Pignato et al. (1995), o método Salmosyst para análise de alimentos apresenta várias vantagens. Em primeiro lugar, apenas dois meios são requeridos, um meio líquido, que serve tanto para o pré-enriquecimento e o enriquecimento seletivo e um meio sólido para isolamento seletivo, em vez dos cinco meios exigidos pelo método convencional. Além disso, o tempo total necessário para realizar a análise é reduzido de quatro a seis dias para 48 horas. Na verdade, o pré-enriquecimento em caldo Salmosyst e o enriquecimento seletivo são limitados, respectivamente, a seis e 18 horas, enquanto um novo período de 24 horas é suficiente para a incubação das placas com o meio sólido para o isolamento seletivo.

Os resultados deste estudo corroboram com pesquisa feita por Fierens e Huyghebaert (1996), com um total de 217 amostras de alimentos tanto de origem animal quanto vegetal, 21 amostras foram positivas para *Salmonella* spp., sendo que destas, o método microbiológico convencional detectou 17 (81,0%) e o método Salmosyst detectou apenas oito (38,1%). Segundo os mesmos autores, nesta técnica onde duas etapas são unidas, buscou-se um curto enriquecimento líquido, proporcionando uma economia de tempo de 24 h em relação ao método convencional. Porém, a baixa recuperação de *Salmonella* spp. pode ser devido a vários fatores, como a fase de pré-enriquecimento curto de 6-8 h, o enriquecimento num meio com baixa seletividade ou a incubação a uma temperatura de 37°C.

Para Blackburn (1993), a redução dos períodos de incubação do pré-enriquecimento e enriquecimento para 6-8 h tem sido bastante confiável em relação aos métodos convencionais completos, mas em alguns casos pode levar a um número elevado de resultados falso-negativos.

O valor do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) calculado para se observar se houve associação entre tipo de hambúrguer e frequência de *Salmonella* spp. de acordo com o método escolhido (Grau de Liberdade (GL)=3) foi de 2,71, para

$p=0,4386$ . Sendo menor que os valores tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (11,34) e  $\alpha=0,05$  (7,81), concluindo-se serem não-significativos os desvios observados, podendo ser atribuídos ao acaso, isto é, a frequência de hambúrgueres contaminados por *Salmonella* spp., tanto do tipo de carne bovina quanto o misto, não dependeram do método utilizado.

Para se observar se houve associação entre método utilizado e incidência de *Salmonella* spp. (GL=1), o valor calculado do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), foi de 1,558, para  $p=0,2119$ . Sendo menor que os valores tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (6,64) e  $\alpha=0,05$  (3,84), indicando que não há diferença significativa entre as frequências observadas e as frequências esperadas, podendo ser atribuídos ao acaso.

O valor calculado pelo teste de McNemar foi de 1,5625 (para todos os tipos de hambúrgueres); 3,125 (hambúrgueres de carne bovina) e 0,125 (hambúrgueres mistos), sendo todos eles menores que os tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (6,64) e  $\alpha=0,05$  (3,84), indicando que há concordância nos resultados de pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres entre os dois diferentes métodos utilizados na investigação.

Os resultados obtidos, em relação aos testes diagnósticos, indicaram que o método convencional para pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres apresentaram médio valor de sensibilidade (54,55%) e altos valores à especificidade (84,06%) e à precisão (80,0%). Já o método Salmosyst apresentou baixo valor para a sensibilidade (35,29%), podendo, assim, apresentar indivíduos falsos-negativos, e altos valores para especificidade (92,06%), apresentando-se bastante confiável o seu diagnóstico quanto aos indivíduos negativos, e precisão também de 80,0%.

Sendo assim, o método convencional apresentou-se com maior capacidade de identificar os verdadeiros positivos, enquanto que o método Salmosyst apresentou uma melhor capacidade de identificar os verdadeiros negativos. Quanto à precisão, os dois métodos apresentaram-se com resultados apreciáveis quanto à pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres.

### **3.2.3 Reação em cadeia da polimerase**

Das 80 amostras analisadas de hambúrgueres crus pelo método da PCR, 18 (22,5%) apresentaram contaminação por *Salmonella* spp., sendo que oito

(10,0%) foram detectadas somente pela PCR a partir do Caldo de Pré-enriquecimento da microbiologia convencional (Solução Salina Peptonada Tamponada – SSPT), após 24 horas de incubação; oito (10,0%) a partir do Caldo Seletivo com Suplemento do método Salmosyst, também após 24 horas de incubação e duas (2,5%) por ambos os métodos. Sendo assim, cada um dos métodos, tanto a PCR a partir do Caldo de Pré-enriquecimento da microbiologia convencional, quanto a PCR a partir do Caldo Seletivo com Suplemento Salmosyst, identificaram cada um deles, dez (12,5%) amostras positivas para *Salmonella* spp., respectivamente (**TABELA 8**).

**TABELA 8.** Resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus através da reação em cadeia da polimerase de acordo com os diferentes Caldos de pré-enriquecimento e tempos de incubação.

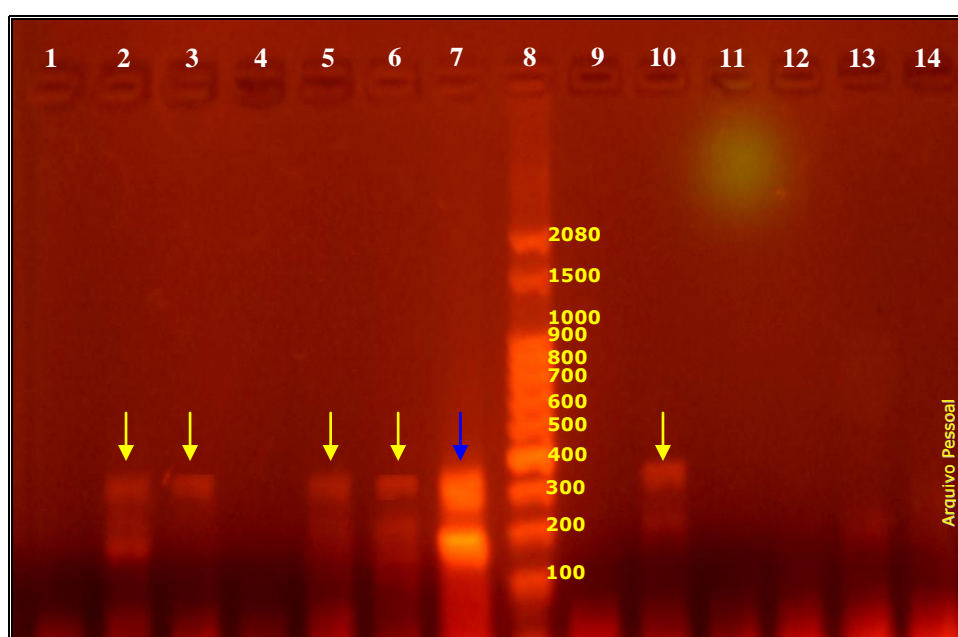
RESULTADOS	Caldo de Pré-enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional	Caldo Base Salmosyst para Pré-enriquecimento (CBSY)	Caldo de Pré-enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional	Caldo Seletivo com Suplemento do método Salmosyst
Tempo de Incubação	6 horas	6 horas	24 horas	24 horas
Amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp.	1 (1,25%)	1 (1,25%)	10 (12,5%)	10 (12,5%)
Amostras negativas para <i>Salmonella</i> spp.	79 (98,75%)	79 (98,75%)	70 (87,5%)	70 (87,5%)

Importante destacar que do total das 18 amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp., oito (44,44%) foram detectadas somente pela PCR a partir do Caldo de Pré-enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional, oito (44,44%) somente pela PCR a partir do Caldo com Suplemento do método Salmosyst e apenas duas (11,11%) por ambos os Caldos (**TABELA 9**).

**TABELA 9.** Número de amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp. de acordo com o tipo de Caldo utilizado, evidenciando as amostras que foram positivas em ambos os Caldos.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE				
Tipo de Hambúrguer	Caldo de Pré-enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional (24 horas)	Caldo Seletivo com Suplemento do método Salmosyst (24 horas)	Ambos	TOTAL
Carne Bovina	4	4	---	<b>8 (44,44%)</b>
Carne Bovina+Carne de Frango	4	4	2	<b>10 (55,56%)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>8 (44,44%)</b>	<b>8 (44,44%)</b>	<b>2 (11,11%)</b>	<b>18 (100%)</b>

A partir da SSPT da microbiologia convencional, após seis horas de incubação, apenas uma (1,25%) amostra apresentou contaminação por *Salmonella* spp., sendo que esta amostra também foi positiva após 24 horas de incubação. Obteve-se o mesmo resultado a partir do Caldo Base Salmosyst para Pré-enriquecimento (CBSY), que foi incubado até seis horas, onde apenas uma (1,25%) amostra foi positiva para *Salmonella* spp., que também apresentou resultado positivo após 24 horas de incubação. Um exemplo de gel de agarose de eletroforese do produto de PCR a partir do gene *invA* pode ser observado na **FIGURA 13.**



**FIGURA 13.** Gel de agarose de eletroforese do produto da PCR a partir do gene *invA*. **8:** marcador de pares de base (100pb); **7:** controle positivo (*Salmonella* Enteritidis) (seta azul); **9:** controle negativo; **2, 3, 5, 6, 10:** amostras positivas (284pb) (seta amarela); **1, 4, 11, 12, 13, 14:** amostras negativas.



O valor do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) calculado para se observar se houve associação entre os diferentes resultados de detecção de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus de acordo com o tempo de incubação dos Caldos utilizados para a PCR (GL=3) foi de 15,8145, para  $p=0,012$ . Sendo maior que os valores tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (11,34) e  $\alpha=0,05$  (7,81), concluindo-se serem significativos os desvios observados, isto é, a frequência de amostras de hambúrgueres crus contaminados por *Salmonella* spp., dependeram do método utilizado.

O valor calculado pelo teste de McNemar para avaliar o grau de discordância dos dois tratamentos (PCR a partir do Caldo de Pré-enriquecimento da microbiologia convencional e PCR a partir do Caldo Seletivo com Suplemento Salmosyst) foi de 0,0625 ( $p=0,8026$ ), sendo menor que os tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (6,64) e  $\alpha=0,05$  (3,84), indicando que não há discordância nos resultados de pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus analisados pela PCR, a partir dos diferentes tipos de Caldos incubados por 24 horas, utilizados na investigação.

Das 18 (22,5%) amostras, positivas para *Salmonella* spp., oito (10,0%) eram de hambúrgueres de carne bovina e dez (12,5%) eram mistos (carne bovina e carne de frango) (**TABELA 10**).

**TABELA 10.** Número de *Salmonella* spp. detectadas nas amostras de hambúrgueres de carne bovina e misto (carne bovina e carne de frango) analisadas pela PCR.

Tipo de Hambúrguer	<i>Salmonella</i> spp. (PCR)		<b>TOTAL</b>
	Positivo	Negativo	
Carne Bovina	8	32	<b>40</b>
Carne Bovina+Carne de Frango	10	30	<b>40</b>
<b>TOTAL</b>	<b>18 (22,5%)</b>	<b>62 (77,5%)</b>	<b>80 (100%)</b>

O valor do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) calculado para se observar se houve associação entre tipo de hambúrguer e incidência de *Salmonella* spp. (GL=1) foi de 0,287, para  $p=0,5923$ . Sendo menor que os valores tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (6,64) e  $\alpha=0,05$  (3,84), indicando que não há diferença significativa entre as frequências observadas e as frequências esperadas, podendo ser atribuídos ao acaso.

Das 80 amostras de hambúrgueres analisadas, através da PCR, a partir do Caldo de Pré-enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional, dez (12,5%) apresentaram-se contaminados pela *Salmonella* spp., sendo que das 40 amostras de hambúrgueres de carne bovina, quatro (10,0%) apresentaram positividade para *Salmonella* spp. e das 40 amostras de hambúrgueres mistos, seis (15,0%) estavam contaminados por *Salmonella* spp. Os mesmos valores também foram encontrados nas 80 amostras analisadas pela PCR a partir do Caldo Seletivo com Suplemento do método Salmosyst (**TABELA 11**). Sendo assim, não houve diferença entre os resultados encontrados em relação aos diferentes Caldos utilizados na PCR.

**TABELA 11.** Número de amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp. conforme o tipo de Caldo utilizado e o tipo de hambúrguer.

Tipo de Hambúrguer	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	
	Caldo de Pré-enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional (24 horas)	Caldo Seletivo com Suplemento do método Salmosyst (24 horas)
Carne Bovina	4 (40,0%)*	4 (40,0%)
Carne Bovina+Carne de Frango	6 (60,0%)	6 (60,0%)
<b>TOTAL</b>	<b>10 (100%)</b>	<b>10 (100%)</b>

\* Porcentagens calculadas de acordo com o total de cada Caldo utilizado.

Segundo Stone et al. (1995), para a detecção de *Salmonella* spp., a etapa de pré-enriquecimento é importante para a realização da PCR devido principalmente ao baixo valor, pois é barata se comparada com outros meios e/ou reagentes; não precisa de muita manipulação e/ou técnica; dilui as substâncias inibidoras da PCR; além de propiciar o aumento de células viáveis de *Salmonella* spp.

Os resultados encontrados neste trabalho, corroboram com Myint et al. (2006) que observaram ao realizarem a PCR sem o pré-enriquecimento, que em nenhuma amostra naturalmente contaminada detectou-se *Salmonella* spp., entretanto, quando utilizou-se a etapa de pré-enriquecimento a sensibilidade da PCR aumentou até 79%. Também Croci et al. (2004) afirmaram que a melhor sensibilidade da PCR em amostras contaminadas artificialmente ocorre a partir do pré-enriquecimento de no mínimo cinco horas.

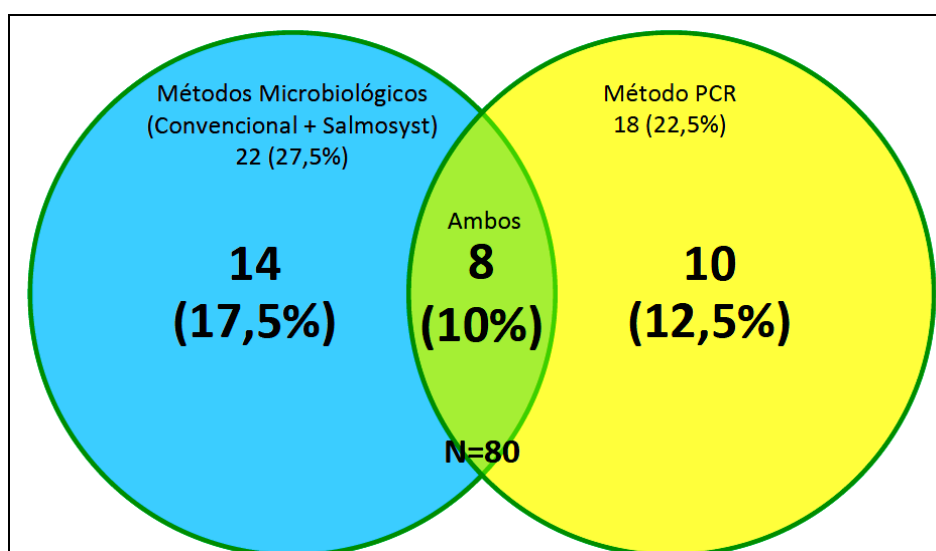
Santos et al. (2001b) observaram que, sobre diferentes tempos de incubação, seus resultados negativos aconteceram quando as amostras de carne foram incubadas em caldos de pré-enriquecimento somente até seis e oito horas. Sendo que os resultados positivos ocorreram após 24 horas de incubação, conforme resultados encontrados na presente pesquisa. Também em estudo realizado por Rissato et al. (2011), em carcaças de frango resfriadas pela PCR, os resultados obtidos na pesquisa de *Salmonella* spp. de acordo com os diferentes tempos de incubação, observou-se que a sensibilidade da técnica da PCR utilizando a água de lavagem (água salina peptonada 1%) sem incubação foi de 0%. Após o pré-enriquecimento de 24 horas a sensibilidade foi de 3,3% (1/30) e depois de 48 horas de incubação a sensibilidade aumentou para 16,7% (5/30).

Em contrapartida, os resultados obtidos por Marsiglia et al. (1997), através da realização da PCR diretamente do caldo de pré-enriquecimento de amostras de alimentos foi inferior ao esperado. Em seu estudo, a detecção pela PCR só foi possível em amostras de alimentos contaminados artificialmente com contagens altas de *Salmonella* spp. Resultado similar foi obtido por Aabo et al. (1993), que detectaram apenas uma de 12 amostras naturais positivas de *Salmonella* spp. em PCR realizada diretamente do caldo de pré-enriquecimento. A presença de inibidores da *Taq* DNA polimerase, bem como de DNA de outros microrganismos podem ser responsáveis pela baixa eficiência destes ensaios.

Ao contrário dos resultados encontrados neste estudo, Ferretti et al. (2001) pesquisaram a presença de *Salmonella* spp. inoculando-a artificialmente em alimentos e depois utilizando, para a PCR, diferentes tempos de incubação a 37°C/24 h do caldo de pré-enriquecimento não seletivo (duas, quatro, seis e oito horas). *Salmonella* spp. foram indetectáveis imediatamente após a inoculação e após duas horas de incubação em caldo de pré-enriquecimento, já os homogêneos de 100 mL com inoculação de  $10^4$ ,  $10^3$ , e  $10^2$  de células de *Salmonella* spp., foi positivo após quatro horas de pré-enriquecimento. Após seis horas, a *Salmonella* spp. também foi detectável nas amostras inoculadas com dez células e uma célula por 100 mL de homogêneo, respectivamente. A sensibilidade do método não foi aumentada após oito horas de pré-enriquecimento, permitindo assim a definição do tempo de pré-enriquecimento ótimo como seis horas.

### 3.2.4 Comparação entre os métodos microbiológicos e a PCR

Do total de 80 amostras de hambúrgueres crus analisado, todas devidamente inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), 32 (40,0%) das amostras apresentaram-se contaminadas pelo microrganismo *Salmonella* spp., estando assim em condições sanitárias insatisfatórias e impróprias para o consumo humano, conforme preconizado na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2001). Sendo que destas, 14 (17,5%) foram identificadas somente pelos métodos microbiológicos; 10 (12,5%) somente pelo método da PCR e oito (10,0%) por ambos os métodos (**FIGURA 14**).



**FIGURA 14.** Número de amostras positivas para *Salmonella* spp. a partir dos métodos microbiológicos (convencional+Salmosyst) e da PCR.

De uma forma mais específica, podem-se discriminar os números de amostras positivas para *Salmonella* spp. através da seguinte maneira, no método da microbiologia convencional foram identificadas 17 (21,25%) amostras de hambúrgueres crus positivas para *Salmonella* spp., enquanto que no método Salmosyst foram identificadas 11 (13,75%) e na PCR foram diagnosticadas 18 (22,5%) amostras positivas (**TABELA 12**). Apenas três (7,5%) amostras foram positivas para *Salmonella* spp. para os três métodos.

**TABELA 12.** Número de amostras positivas para *Salmonella* spp. detectadas pelos métodos microbiológicos (convencional e Salmosyst) e pela reação em cadeia da polimerase, de acordo com o tipo de hambúrguer.

Tipo de Hambúrguer	Microbiologia Convencional		Método Salmosyst		P C R	
	<i>Salmonella</i> (+)	<i>Salmonella</i> (-)	<i>Salmonella</i> (+)	<i>Salmonella</i> (-)	<i>Salmonella</i> (+)	<i>Salmonella</i> (-)
Bovino	9	31	3	37	8	32
Misto	8	32	8	32	10	30
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>63</b>	<b>11</b>	<b>69</b>	<b>18</b>	<b>62</b>

O valor do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) calculado para se observar se houve associação entre o tipo de hambúrguer e a incidência de *Salmonella* spp. de acordo com os métodos escolhidos – microbiologia convencional; método Salmosyst e PCR – (GL=5) foi de 3,209, para  $p=0,6679$ . Sendo menor que os valores tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (15,09) e  $\alpha=0,05$  (11,07), concluindo-se serem não-significativos os desvios observados, podendo ser atribuídos ao acaso, isto é, a frequência de hambúrgueres contaminados por *Salmonella* spp., tanto do tipo de carne bovina quanto o misto, não dependeram do método de análise utilizado.

Das 18 amostras identificadas pela PCR, oito (10,0%) foram detectadas somente a partir do Caldo de Pré-enriquecimento da microbiologia convencional (Solução Salina Peptonada Tamponada – SSPT), após 24 horas de incubação; oito (10,0%) a partir do Caldo Seletivo de Enriquecimento do método Salmosyst, também após 24 horas de incubação e duas (2,5%) a partir de ambos os caldos (**TABELA 13**).

**TABELA 13.** Número de amostras positivas para *Salmonella* spp. detectadas pelos métodos microbiológicos (convencional e Salmosyst) e pela reação em cadeia da polimerase.

RESULTADOS	MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS		REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	
	Microbiologia Convencional	Método Salmosyst	A partir do Caldo de Pré-enriquecimento da Microbiologia Convencional (24 h)	A partir do Caldo de Pré-enriquecimento com Suplemento do Método Salmosyst (24 h)
Nº de amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp.	17 (21,25%)	11 (13,75%)	10 (12,5%)	10 (12,5%)
Nº de amostras negativas para <i>Salmonella</i> spp.	63 (78,75%)	69 (86,25%)	70 (87,5%)	70 (87,5%)
<b>TOTAL</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>80</b>

O valor do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) calculado para se observar se houve associação entre os diferentes resultados de detecção de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus de acordo com os métodos escolhidos (microbiologia convencional; método Salmosyst; PCR a partir da SSPT; PCR a partir do Caldo de Pré-enriquecimento com Suplemento Salmosyst) (GL=3) foi de 3,333, para  $p=0,3430$ . Sendo menor que os valores tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (11,34) e  $\alpha=0,05$  (7,81), concluindo-se serem não-significativos os desvios observados, podendo ser atribuídos ao acaso, isto é, a frequência de amostras de hambúrgueres crus contaminados por *Salmonella* spp., não dependeram do método utilizado.

O valor calculado pelo teste de McNemar foi de 1,7143 com  $p=0,1904$  (para microbiologia convencional e PCR) foi de 0,0 com  $p=1,0$  (método Salmosyst e PCR), sendo todos menores que os tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (6,64) e  $\alpha=0,05$  (3,84), indicando que não há discordância nos resultados de pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus analisados pelos diferentes métodos de investigação.

Os resultados obtidos, em relação aos testes diagnósticos, foram indicativos que os métodos microbiológicos para pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres apresentaram baixo valor de sensibilidade (36,36%), podendo, assim, apresentar indivíduos falsos-negativos, e alto valor à especificidade (82,76%), apresentando-se bastante confiável o seu diagnóstico quanto aos indivíduos negativos. Já a metodologia da PCR apresentou baixo valor para a sensibilidade (44,44%) e médio valor para especificidade (77,42%). Em ambos os métodos a precisão foi de 70,0%.

Os métodos microbiológicos e a PCR foram semelhantes em relação à identificação dos verdadeiros positivos, porém nos métodos microbiológicos foi observada uma melhor capacidade de identificar os verdadeiros negativos. Quanto à precisão, os dois métodos foram considerados com resultados regulares quanto à pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus.

A importância da fase de pré-enriquecimento para a PCR pode ser evidenciada, tal como no presente trabalho, pela pesquisa de *Salmonella* spp. realizada por Rissato et al. (2011), em carcaças de frango resfriadas, pela técnica da PCR, onde das 30 amostras analisadas cinco (16,7%) foram positivas. Sendo que observou-se que a sensibilidade da PCR após pré-enriquecimento com incubação de 24 horas foi de 3,3% (1/30) e quando realizada após 48 horas de

incubação a sensibilidade aumentou para 16,7% (5/30). Em trabalho semelhante Mynt et al. (2006) verificaram que a PCR, sem a etapa de pré-enriquecimento não houve detecção da *Salmonella* spp., porém quando esta foi utilizada a sensibilidade aumentou para 79%. Santos et al. (2001b) e Croci et al. (2004) também confirmaram que a sensibilidade da PCR aumenta após a etapa do pré-enriquecimento.

Stone et al. (1995) descreveram que a etapa de pré-enriquecimento possui vantagens para a técnica da PCR, pois os caldos de enriquecimento são baratos, requerem pouca manipulação, diluem substâncias que podem inibir a PCR e aumentam o número de células bacterianas viáveis. Segundo Cheung e Kam (2012), para aumentar o limite de detecção de *Salmonella* spp., torna-se necessário incluir um pré-enriquecimento para permitir a multiplicação das células bacterianas da amostra. Além disso, esta etapa pode também ajudar a reduzir o risco de amplificar sequências a partir de células mortas na amostra.

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram os de Silva et al. (2011) que compararam o isolamento microbiológico convencional com a PCR no diagnóstico de salmonelose em bezerros infectados experimentalmente e concluíram que pelo teste de McNemar o método convencional foi superior à PCR na detecção de amostras positivas para *Salmonella* Typhimurium. Também Oliveira et al. (2003) afirmaram que a PCR utilizando o pré-enriquecimento não seletivo foi o método menos sensível, para a detecção genérica de *Salmonella* em comparação com o método convencional.

Em contrapartida, Rall et al. (2009) pesquisaram *Salmonella* spp. em 50 amostras de carne de frango e 75 amostras de linguiças frescas, encontrando 27 (54%) amostras de carne de frango positivas através da PCR e apenas quatro (8%) pela metodologia convencional e 42 (56%) amostras de linguiças frescas contaminadas pela *Salmonella* spp. utilizando a PCR contra apenas sete (9,3%) pela metodologia convencional. Neste trabalho ficou evidente que a PCR foi mais sensível que a metodologia microbiológica convencional.

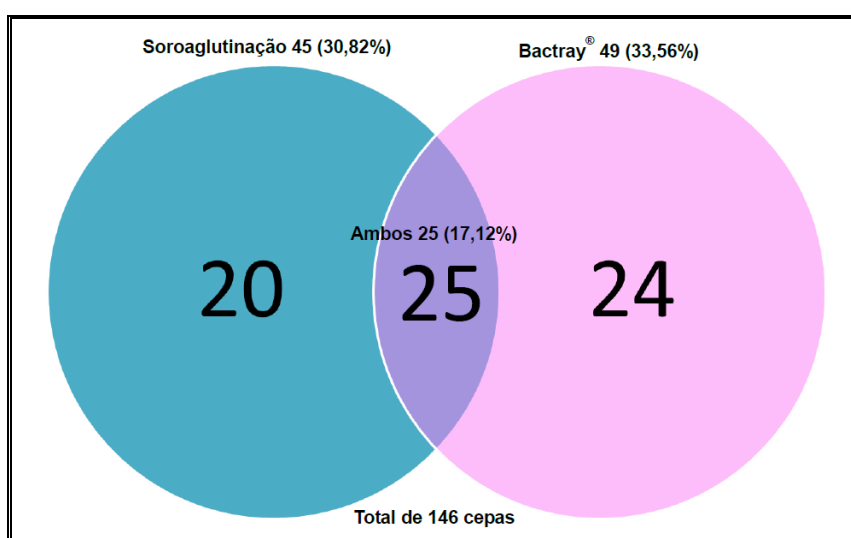
Os percentuais de isolamento encontrados nesta pesquisa, quer seja pelos métodos microbiológicos ou pelo método da PCR não corroboraram com os achados de outros pesquisadores, tais como os de Dickel et al. (2005b) que verificaram, em análise comparativa entre microbiologia convencional e PCR para pesquisa de *Salmonella* spp., ao analisarem 300 amostras de carne de frango, que no método convencional foi encontrado 170 (56,6%) amostras positivas,

enquanto que a PCR verificou-se 225 (75%) amostras contaminadas. Em pesquisa realizada por Kawasaki et al. (2001), com 98 amostras de diversos alimentos, 37 (37,76%) amostras foram positivas para *Salmonella* spp. através da metodologia convencional, 42 (42,86%) pela PCR e 34 (34,69%) por ambos os métodos. E de um total de 268 amostras suínas, Castagna et al. (2005) detectaram que 54 (20,15%) foram positivas para *Salmonella* spp. utilizando PCR, 42 (15,67%) pela metodologia convencional e 39 (14,55%) por ambos os métodos. Porém, nenhum destes trabalhos o alimento analisado era de hambúrguer cru bovino ou misto (carne bovina e carne de frango).

### 3.2.5 Comparação entre a sorologia e o sistema Bactray®

Para a identificação das cepas provenientes do meio TSI, após resultados bioquímicos (triagem primária e triagem secundária) característicos do microrganismo *Salmonella* spp., utilizou-se dois diferentes métodos: a sorologia baseada na IN nº 62 (BRASIL, 2003) e o sistema Bactray® I e II.

Das 146 cepas analisadas pela sorologia, 45 (30,82%) apresentaram resultado positivo para a identificação de *Salmonella* spp., enquanto das cepas analisadas pelo sistema Bactray® I e II, 49 (33,56%) foram identificadas como *Salmonella* spp. Do total das 146 cepas testadas, 25 (17,12%) foram identificadas como *Salmonella* spp. em ambos os métodos (**FIGURA 15**).



**FIGURA 15.** Resultados positivos para a identificação de *Salmonella* spp. em hambúrgueres utilizando a sorologia e o sistema Bactray®.



Em estudo realizado por Bezerra et al. (2010), que pesquisou a presença de *Salmonella* spp. em 105 amostras de sanduíches de hambúrgueres em Cuiabá-MT, através de sorologia após a triagem bioquímica, não foi encontrado contaminação em nenhuma das amostras. Esse mesmo resultado também aconteceu em pesquisa feita por Santa et al. (2012), onde foram analisadas 50 amostras de salames de diferentes pequenas indústrias. Porém na metodologia utilizou-se o sistema Bactray® I e II para a identificação bioquímica de *Salmonella* spp.

O valor calculado pelo teste de McNemar foi de 0,2045 ( $p=0,6511$ ), sendo menor que os tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (6,64) e  $\alpha=0,05$  (3,84), concluindo-se que há concordância nos resultados de identificação de *Salmonella* spp. em hambúrgueres entre os dois diferentes métodos utilizados na investigação.

Nos resultados obtidos, em relação aos testes diagnósticos, ocorreu a indicação de que a sorologia para a identificação de *Salmonella* spp. possuíam médios valores de sensibilidade (51,02%) e alta especificidade (79,38%) e que no sistema Bactray® I e II também foram encontrados valores semelhantes de sensibilidade (55,56%) e de especificidade (76,24%) em relação a sorologia. Ambos os métodos foram caracterizados com precisão de 69,86%.

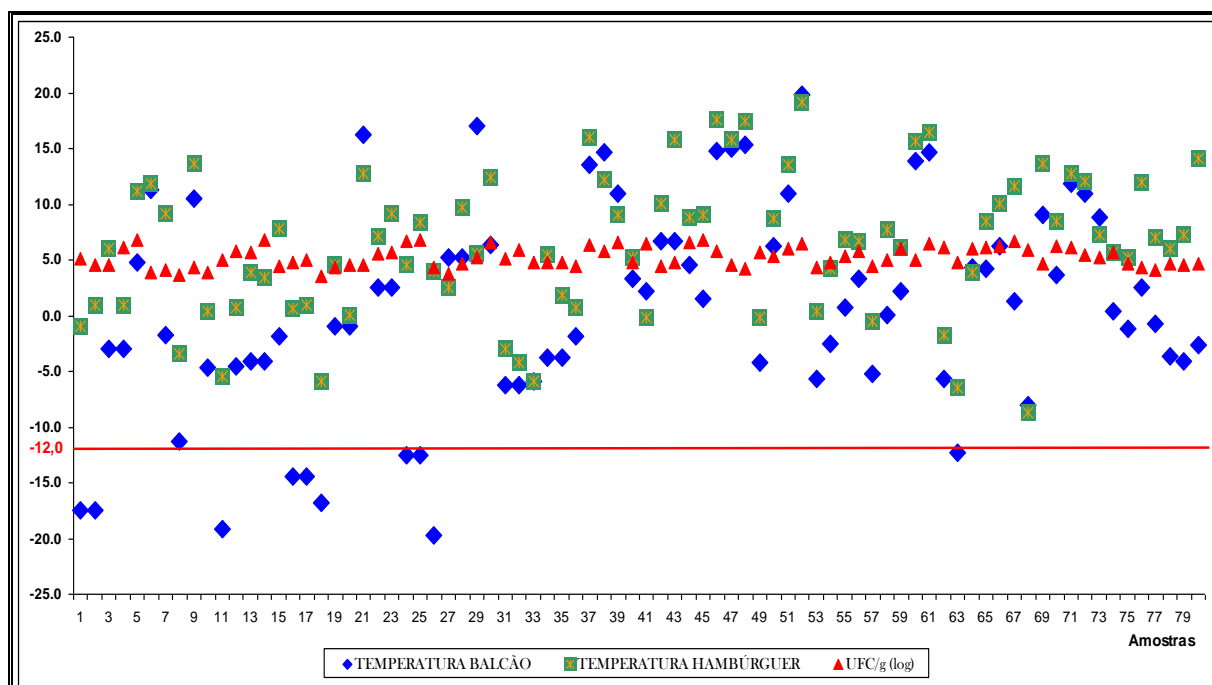
### **3.2.6 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas**

Os resultados da CBHAM variaram de  $3,8 \times 10^3$  UFC/g até  $6,5 \times 10^6$  UFC/g, com uma média calculada de  $1,8 \times 10^5$  UFC/g. Dos 80 hambúrgueres analisados, 43 (53,75%) tiveram contagem acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g (**TABELA 14**) (**FIGURA 16**), observando-se baixa qualidade higiênico-sanitária destes produtos. Dos 40 hambúrgueres de carne bovina, 25 (62,5%) possuíam contagem acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g e dos 40 hambúrgueres mistos, 18 (45,0%) estavam comprometidos. Na legislação brasileira não consta limites de tolerância para CBHAM, contagem de coliformes a 35°C e contagem total de fungos filamentosos e leveduras para hambúrgueres. Porém, tem sido observado que a CBHAM acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g em carne moída fresca compromete o produto em relação à sua qualidade higiênico-sanitária (MORTON, 2001; SILVA et al., 2007).

**TABELA 14.** Número de amostras que se encontravam fora dos padrões em relação a contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas e temperaturas dos balcões e dos hambúrgueres, com suas respectivas médias e desvios padrões (DP).

ANÁLISES	Média $\pm$ DP	Padrão N (%)	Fora do Padrão N (%)	TOTAL
Temperatura dos Balcões Frigoríficos	0,720 $\pm$ 9,2913	10 (12,5%)	70 (87,5%)	<b>80</b>
Temperatura dos Hambúrgueres	6,275 $\pm$ 6,4110	--- (0%)	80 (100%)	<b>80</b>
Contagem Padrão Aeróbios Mesófilos	5,261* $\pm$ 0,8891	37 (46,25%)	43 (53,75%)	<b>80</b>

\* log UFC/g



**FIGURA 16.** Temperaturas dos balcões frigoríficos, temperaturas dos hambúrgueres e enumeração das bactérias aeróbias mesófilas (log UFC/g).

Tavares e Serafini (2003) verificaram a qualidade de hambúrgueres de carne bovina na cidade de Goiânia, encontrando resultados diferentes a este estudo, que variaram entre a faixa de  $10^1$  e  $10^4$  UFC/g. Todos inferiores ao valor de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g encontrando-se em condições microbiológicas satisfatórias. Porém, estas análises foram realizadas em hambúrgueres prontos para o consumo, consequentemente a cocção do produto pode ter tido um efeito de decréscimo do número de BHAM nestes hambúrgueres.

Também Carvalho et al. (2005), ao analisarem cinco amostras de hambúrgueres de frango, encontraram nenhuma com CBHAM acima de  $1,0 \times 10^5$

UFC/g, sendo que o valor mínimo encontrado foi de  $2,3 \times 10^3$  UFC/g e o valor máximo de  $2,5 \times 10^4$  UFC/g, resultado que levam a interpretação de que estes produtos estavam em condições apropriadas para o consumo. Porém, Mota et al. (2009) analisaram 15 amostras de sanduíches (pão, hambúrguer, queijo, alface e tomate) comercializados em três redes de "fast-food" e observaram que a CBHAM em quatro (26,67%) amostras. A contagem total dos produtos variou de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g a  $6,4 \times 10^5$  UFC/g.

Em trabalho realizado por Parra et al. (2002) que analisaram 27 amostras de três diferentes marcas de hambúrgueres (duas de carne bovina e uma de frango), a CBHAM foi muito mais elevada do que o presente estudo. A média foi de  $1,0 \times 10^{16}$  UFC/g e  $2,2 \times 10^{15}$  UFC/g nos hambúrgueres bovinos e uma média de  $1,7 \times 10^{13}$  UFC/g nos hambúrgueres de frango.

Ratificando a importância do processamento higiênico-sanitário industrial adequado, pode-se observar, de forma positiva, o trabalho realizado por Leal et al. (2008) que analisaram 60 amostras de hambúrgueres de frango, sendo 30 artesanais e 30 industriais, cujo resultados apresentaram alta CBHAM nos produtos artesanais (média de  $2,1 \times 10^7$  UFC/g), enquanto que os hambúrgueres industriais foi encontrada a média de  $3,5 \times 10^1$  UFC/g.

### **3.2.7 Temperaturas dos balcões frigoríficos e dos hambúrgueres**

Dos 80 balcões frigoríficos que tiveram suas temperaturas verificadas apenas 10 (12,5%) se encontravam com temperaturas abaixo de  $-12^\circ\text{C}$  (**TABELA 14**), sendo que a menor temperatura verificada foi de  $-19,7^\circ\text{C}$  e a maior foi de  $19,8^\circ\text{C}$ ., uma variação de  $39,5^\circ\text{C}$  (**FIGURA 16**).

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram os de Prado et al. (2009) que avaliaram as temperaturas de armazenamento de 87 balcões frigoríficos observando valores entre  $6,7^\circ\text{C}$  e  $9,7^\circ\text{C}$  em 35% destes equipamentos além de 12% que se encontravam com temperaturas entre  $9,8^\circ\text{C}$  e  $12,8^\circ\text{C}$ , temperaturas altas que comprometem a qualidade da carne aumentando o risco de ocorrência de um crescimento bacteriano indesejável.

Em outra pesquisa, realizada por Mendes et al. (2001), sobre as condições de comercialização de carne em supermercados em Salvador-BA, constatou-se o mau funcionamento dos equipamentos refrigerados assim como a

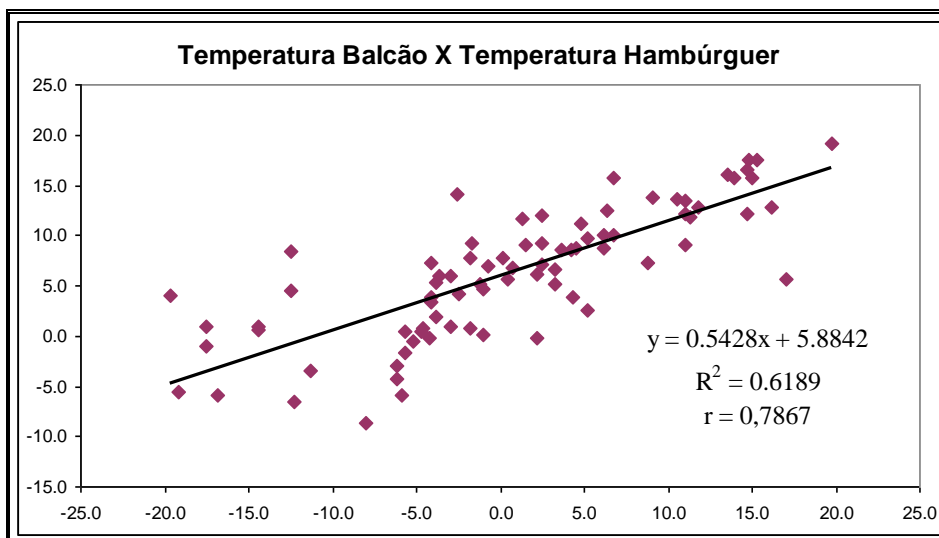
falta de controle adequado das temperaturas de conservação, colocando em risco a qualidade dos produtos e a sua utilização.

Das 80 amostras de hambúrgueres que tiveram as temperaturas verificadas durante sua aquisição, nenhuma possuía temperatura igual ou inferior a  $-12^{\circ}\text{C}$  (**TABELA 14**), tal como indicado no próprio rótulo destes produtos. A menor temperatura observada nos hambúrgueres foi de  $-8,7^{\circ}\text{C}$  e a maior temperatura foi de  $19,2^{\circ}\text{C}$ , uma variação de  $27,9^{\circ}\text{C}$  (**FIGURA 16**), temperaturas favoráveis à multiplicação de microrganismos patogênicos no alimento, aumentando o risco do consumidor de adquirir uma toxinfecção alimentar.

O binômio temperatura e tempo pode ser compreendido melhor verificando-se o trabalho feito por Izquierdo et al. (2004) que avaliaram 56 amostras de hambúrgueres que foram armazenados a temperaturas de  $-10^{\circ}\text{C}$ ;  $4^{\circ}\text{C}$  e  $10^{\circ}\text{C}$ , durante 96 horas. As CBHAM de cada temperatura foram realizadas nos tempos 0 h (menos de seis horas); 48 h e 96 h. As maiores CBHAM ocorreram nos produtos armazenados a  $10^{\circ}\text{C}$  por 96 h ( $6,8 \times 10^5$  UFC/g e  $7,2 \times 10^6$  UFC/g), enquanto que os menores valores se encontraram no tempo 0 h ( $8,1 \times 10^4$  UFC/g e  $1,1 \times 10^5$  UFC/g). Este trabalho ratifica a importância do armazenamento de produtos cárneos em temperaturas de congelamento a  $-12^{\circ}\text{C}$  evitando assim o aumento significativo de BHAM nestes alimentos.

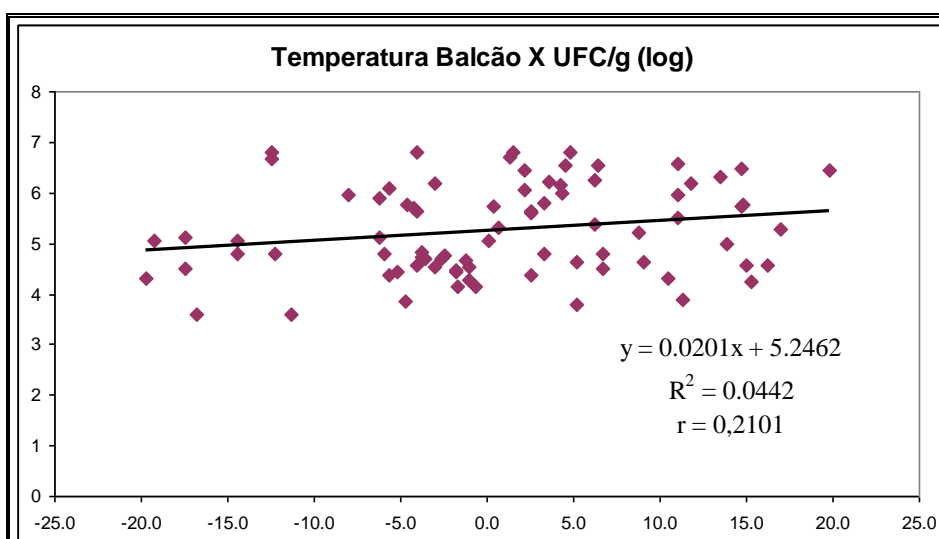
Também Ramírez et al. (2006) analisaram 81 amostras de hambúrgueres de carne bovina armazenados a temperaturas de  $-15^{\circ}\text{C}$ ;  $5^{\circ}\text{C}$  e  $15^{\circ}\text{C}$  nos diferentes tempos de 0 h; 48 h e 96 h, considerando o tempo que transcorre desde a elaboração destas carnes até o consumo. As médias das CBHAM variaram entre  $1,1 \times 10^6$  UFC/g na temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$ ;  $8,7 \times 10^5$  UFC/g a  $5^{\circ}\text{C}$  e  $1,1 \times 10^6$  UFC/g a  $15^{\circ}\text{C}$ . Em relação ao tempo de armazenamento as médias encontradas foram de  $2,1 \times 10^6$  UFC/g no tempo 0 h;  $1,1 \times 10^6$  UFC/g em 48 h e  $4,8 \times 10^5$  no tempo 96 h. Todos os resultados acima dos limites máximos ( $1,0 \times 10^5$  UFC/g), conforme preconizam Morton (2001) e Silva et al. (2007).

Ao utilizar o coeficiente de correlação ( $r$ ) para verificar o grau de dependência entre os valores encontrados nas amostras analisadas dos hambúrgueres, entre temperatura dos balcões frigoríficos, temperatura dos hambúrgueres e BHAM, verificou-se que todas as variáveis apresentaram correlação linear positiva. Houve uma correlação linear positiva significativa ( $r=0,7867$ ) (**FIGURA 17**) entre as variáveis temperatura dos balcões frigoríficos e temperatura dos hambúrgueres.

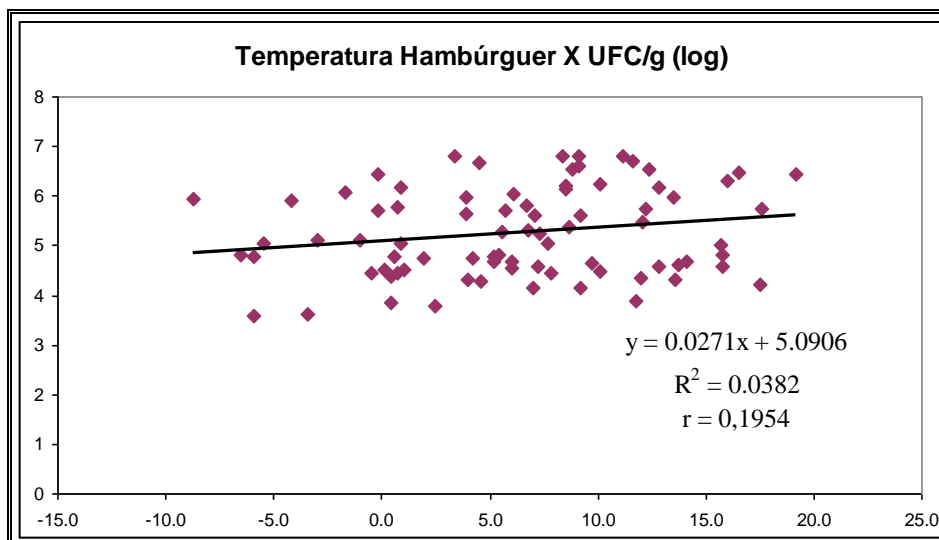


**FIGURA 17.** Correlação entre as temperaturas dos hambúrgueres e as temperaturas dos balcões frigoríficos.

Não houve uma correlação significativa entre as variáveis temperatura dos balcões frigoríficos e BHAM ( $r=0,2101$ ) (**FIGURA 18**) e entre as variáveis temperatura dos hambúrgueres e BHAM ( $r=0,1954$ ) (**FIGURA 19**), concluindo-se que não há apenas um fator específico que determine as condições higiênico-sanitárias dos hambúrgueres, mas sim um conjunto de fatores, tais como os relacionados à microbiota do produto cárneo, tempo de exposição, ingredientes, marca e forma de processamento.



**FIGURA 18.** Correlação entre o número de bactérias heterotróficas aeróbios mesófilas e as temperaturas dos balcões frigoríficos.



**FIGURA 19.** Correlação entre o número de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e as temperaturas dos hambúrgueres.

### 3.2.8 Correlação entre contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de *Salmonella* spp.

Os resultados da CBHAM variaram de  $3,8 \times 10^3$  UFC/g até  $6,5 \times 10^6$  UFC/g, com uma média calculada de  $1,8 \times 10^5$  UFC/g. Dos 80 hambúrgueres analisados, 43 (53,75%) tiveram contagem acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g, indicando uma baixa qualidade higiênico-sanitária destes produtos. Dos 40 hambúrgueres de carne bovina, 25 (62,5%) apresentaram contagem acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g e dos 40 hambúrgueres mistos, 18 (45,0%) estavam comprometidos. Na legislação brasileira não consta limites de tolerância para CBHAM, contagem de coliformes a 35°C e contagem total de fungos filamentosos e leveduras para hambúrgueres. Porém, tem sido observado que a CBHAM acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g em carne moída fresca compromete o produto em relação à sua qualidade higiênico-sanitária (MORTON, 2001; SILVA et al., 2007).

Das 80 amostras de hambúrgueres analisadas, 22 (27,5%) estavam contaminadas por *Salmonella* spp., sendo que destas, oito (36,36%) também apresentavam alta contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM) e 14 (63,64%) com contagem menor que  $10^5$  UFC/g. Verificando-se os resultados das análises da CBHAM, verificou-se que das 43 (53,75%) amostras acima do limite ideal, oito (18,6%) também estavam contaminadas por *Salmonella* spp., enquanto que 35 (81,4%) encontravam-se livres da contaminação por tal bactéria (**TABELA 15**).

**TABELA 15.** Correlação entre os resultados encontrados na contagem padrão de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de *Salmonella* spp. nos hambúrgueres crus analisados.

Resultados das Amostras	CBHAM* >1,0x10 <sup>5</sup> UFC/g	CBHAM ≤1,0x10 <sup>5</sup> UFC/g	TOTAL
<i>Salmonella</i> spp. +	8	14	<b>22 (27,5%)</b>
<i>Salmonella</i> spp. -	35	23	<b>58 (72,5%)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>43 (53,75%)</b>	<b>37 (46,25%)</b>	<b>80 (100%)</b>

\*CBHAM: Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas

Em pesquisa realizada com um total de 27 amostras de hambúrgueres vendidos na cidade de Maracaibo, Venezuela por Parra et al. (2002), sendo 18 de carne bovina e nove de carne de frango, nove (33,33%) hambúrgueres de carne bovina estavam contaminados por *Salmonella* spp., enquanto que a CBHAM estavam muito mais elevada do que o presente estudo, com a média de  $1,0 \times 10^{16}$  UFC/g e  $2,2 \times 10^{15}$  UFC/g nos hambúrgueres bovinos e de  $1,7 \times 10^{13}$  UFC/g nos hambúrgueres de frango.

Ratificando a importância do processamento higiênico-sanitário industrial adequado, pode-se observar, de forma positiva, o trabalho realizado por Leal et al. (2008) que analisaram 60 amostras de hambúrgueres de frango, sendo 30 artesanais e 30 industriais, cujo resultados apresentaram alta CBHAM nos produtos artesanais (média de  $2,1 \times 10^7$  UFC/g), enquanto que os hambúrgueres industriais apresentaram uma média de  $3,5 \times 10^1$  UFC/g. Nesta mesma pesquisa isolou-se *Salmonella* spp. em um (1,66%) hambúrguer, sendo este elaborado de forma artesanal.

Em trabalho experimental realizado por Ramírez et al. (2006) onde foram analisadas 81 amostras de hambúrgueres, armazenados em diferentes temperaturas (-15°C; 5°C e 15°C) e intervalos de tempo (0 h; 48 h e 96 h), somente uma (1,23%) estava contaminada por *Salmonella* spp. A amostra contaminada havia sido armazenada a 15°C por 96 horas, mostrando que este resultado provavelmente se deve ao binômio temperatura-tempo permitindo que a *Salmonella* spp. possa se multiplicar, caso presente no alimento, ao mesmo tempo em que ocorre redução da microbiota contaminante inicial, já que a *Salmonella* spp. é fraca competidora. Pois a CBHAM foi diminuindo de acordo com o tempo de armazenamento, sendo encontrados os seguintes valores

médios de BHAM,  $2,1 \times 10^6$  UFC/g (0 h),  $1,1 \times 10^6$  UFC/g (48 h) e  $4,8 \times 10^5$  UFC/g (96 h).

Tavares e Serafini (2003) verificaram a qualidade de 100 hambúrgueres de carne bovina na cidade de Goiânia, encontrando resultados diferentes a este estudo, que variaram entre a faixa de  $10^1$  e  $10^4$  UFC/g. Todos inferiores ao valor de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g encontrando-se em condições microbiológicas satisfatórias. Porém, estas análises foram realizadas em hambúrgueres prontos para o consumo, consequentemente a cocção do produto pode ter tido um efeito de decréscimo do número de BHAM nestes hambúrgueres. Neste mesmo estudo não foi evidenciado contaminação por *Salmonella* spp. nos hambúrgueres analisados.

Também Carvalho et al. (2005), ao analisarem cinco amostras de hambúrgueres de frango, não encontrou nenhum com CBHAM acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g, sendo que o valor mínimo encontrado foi de  $2,3 \times 10^3$  UFC/g e o valor máximo de  $2,5 \times 10^4$  UFC/g, resultado que caracteriza estes produtos com condições apropriadas para o consumo. Porém, Mota et al. (2009) analisaram 15 amostras de sanduíches (pão, hambúrguer, queijo, alface e tomate) comercializados em três redes de "fast-food" e observaram que a CBHAM em quatro (26,67%) amostras. A contagem total dos produtos variou de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g a  $6,4 \times 10^5$  UFC/g.

A pesquisa, analisando-se os resultados encontrados, sugere que *Salmonella* spp. é um microrganismo pouco competitivo em alimentos altamente contaminados por outros microrganismos. Segundo Boni et al. (2011), a capacidade de resistência da *Salmonella* spp., às condições adversas do meio ambiente ou alimento, pode variar tornando-se difícil o isolamento deste microrganismo, devido à presença de grande número de outras bactérias na amostra e sua reduzida capacidade competidora na presença de outros patógenos.

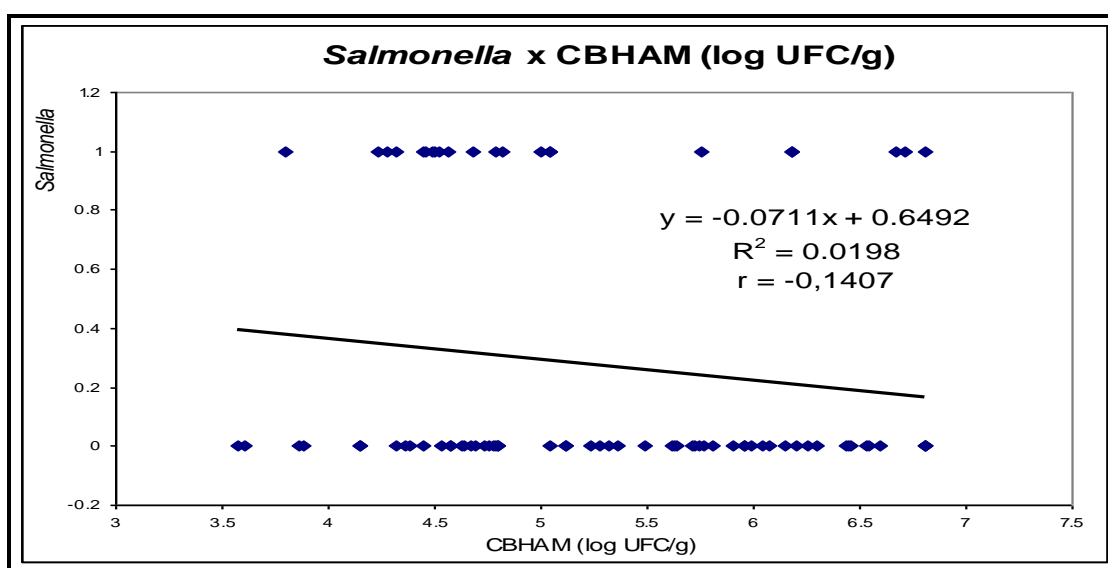
Os resultados deste estudo corroboram os de Brant et al. (2007) que afirmaram que a ausência de *Salmonella* spp. pode ser determinada pela sua menor capacidade de competição, em contra-partida a sua ocorrência em alimentos está, na maioria das vezes, associada às contagens menores de outros contaminantes.

Porém, o valor absoluto do coeficiente de correlação de Spearman ( $r_2$ ) foi de 0,1606 com o valor crítico absoluto do  $t$  calculado de 1,4375 ( $p=0,1545$ ), sendo menor que os valores tabelados com nível de significância 0,05 e 0,01,



mostrando que não houve correlação significativa em relação a contaminação dos hambúrgueres pela *Salmonella* spp. e as altas contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas. Isto é, amostras com alta CBHAM não necessariamente também estarão contaminadas por *Salmonella* spp. e/ou vice-versa.

Tendo em vista o valor de  $p=0,2121$  do coeficiente (-0,3671), estatisticamente não houve relação entre a contaminação por *Salmonella* spp. e a CBHAM nos hambúrgueres crus analisados (**FIGURA 20**). Além disso, a chance do hambúrguer cru estar contaminado por *Salmonella* spp. é de apenas 0,6927 vezes maior se a CBHAM for elevada. A probabilidade para ocorrer contaminação por *Salmonella* spp. sem ocorrer CBHAM elevada nos hambúrgueres crus analisados foi de 63,90% e para ocorrer contaminação por *Salmonella* spp. com CBHAM elevada foi de 71,88%.



**FIGURA 20.** Gráfico de regressão com linha de tendência e valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e correlação ( $r$ ).

Nascimento et al. (2005) afirmaram que a CBHAM constitui um dos melhores indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade higiênicosanitária dos alimentos. Sendo assim, este método deveria ser usado para análises microbiológicas de hambúrgueres crus, com objetivo de identificar deficiências na sanitização, problemas no processamento ou em ingredientes na indústria, a fim de diminuir a carga microbiana do produto cru.

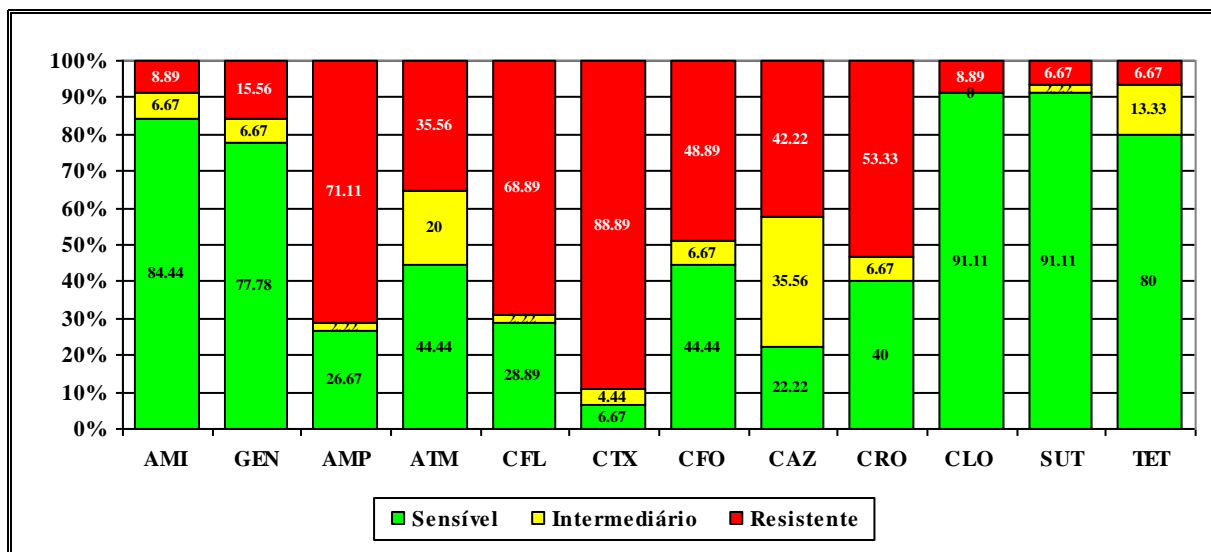
### 3.2.9 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

As cepas de *Salmonella* spp. isoladas apresentaram maior sensibilidade aos agentes antimicrobianos sulfazotrim (91,11%), cloranfenicol (91,11%), amicacina (84,44%), tetraciclina (80,0%), e gentamicina (77,78%) e maior resistência aos antimicrobianos cefotaxina (88,89%), ampicilina (71,11%), cefalotina (68,89%), ceftriaxona (53,33%), cefoxitina (48,89%), ceftazidima (42,22%) e aztreonam (35,56%) (**TABELA 16**).

**TABELA 16.** Frequência absoluta e relativa da sensibilidade das 45 cepas de *Salmonella* spp. isoladas nos hambúrgueres, em relação aos 12 diferentes antimicrobianos testados.

Antimicrobiano ( $\mu\text{g}$ )	SENSÍVEL		RESISTENTE		INTERMEDIÁRIO	
	N	%	N	%	N	%
Amicacina (AMI 30)	38	84,44%	4	8,89%	3	6,67%
Gentamicina (GEN 10)	35	77,78%	7	15,56%	3	6,67%
Ampicilina (AMP 10)	12	26,67%	32	71,11%	1	2,22%
Aztreonam (ATM 30)	20	44,44%	16	35,56%	9	20,0%
Cefalotina (CFL 30)	13	28,89%	31	68,89%	1	2,22%
Cefotaxina (CTX 30)	3	6,67%	40	88,89%	2	4,44%
Cefoxitina (CFO 30)	20	44,44%	22	48,89%	3	6,67%
Ceftazidima (CAZ 30)	10	22,22%	19	42,22%	16	35,56%
Ceftriaxona (CRO 30)	18	40,0%	24	53,33%	3	6,67%
Cloranfenicol (CLO 30)	41	91,11%	4	8,89%	0	0%
Sulfazotrim (SUT 25)	41	91,11%	3	6,67%	1	2,22%
Tetraciclina (TET 30)	36	80,0%	3	6,67%	6	13,33%

Também verificou-se que os antimicrobianos mais eficazes, por ter sido detectado maior número de cepas sensíveis (41/45) foram sulfazotrim (91,11%) e cloranfenicol (91,11%). Enquanto que os menos eficazes, por ser observado maior número de cepas resistentes (40/45) foi cefotaxina (88,89%) (**FIGURA 21**).



**FIGURA 21.** Frequência da sensibilidade das 45 cepas de *Salmonella* spp. isoladas nos hambúrgueres, em relação aos 12 diferentes antimicrobianos testados.

Legenda: AMI Amicacina; GEN Gentamicina; AMP Ampicilina; ATM Aztreonam; CFL Cefalotina; CTX Cefotaxina; CFO Cefoxitina; CAZ Ceftazidima; CRO Ceftriaxona; CLO Cloranfenicol; SUT Sulfazotrim; TET Tetraciclina.

Em trabalho utilizando os mesmos agentes antimicrobianos, Cortez et al. (2006) observaram um comportamento diferente a esta pesquisa, onde de um total de 29 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouro aviário, 25 (86,2%) foram resistentes ao aztreonam, 25 (86,2%) a ampicilina, 21 (72,4%) a tetraciclina e 16 (55,2%) a sulfazotrim. Porém, no presente trabalho ocorreu semelhança em relação a sensibilidade, já que o antimicrobiano que apresentou menor resistência foi a gentamicina, com apenas uma (3,45%) cepa resistente e amicacina com duas (6,9%) cepas resistentes. Além disso, ainda Cortez et al. (2006), verificaram que as cepas apresentaram sensibilidade a gentamicina (96,5%) e a cloranfenicol (48,3%). Nenhuma das cepas testadas apresentou 100% de resistência ou de sensibilidade aos antimicrobianos testados.

Entretanto em pesquisa realizada por Wannaprasat et al. (2011), observou-se que cepas isoladas de carne suína exibiram frequências mais elevadas de resistência a tetraciclina (67%), ampicilina (35%) e cloranfenicol (27%). Taxas mais baixas foram observadas para gentamicina (5%). Já as cepas isoladas de humanos foram resistentes a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina (21%) e tetraciclina (90%)

Com resultados diferentes aos encontrados neste trabalho em relação à resistência, Szych et al. (2001) realizaram testes em 326 cepas de *Salmonella* Enterica para a sensibilidade a antimicrobianos isoladas de fezes de pacientes com diarreia e portadores, durante o período 1998-1999, observando 91,4% de

resistência a tetraciclina e 21,5% a ampicilina. Porém, também foram observados menores níveis de resistência para cloranfenicol e gentamicina.

Os resultados do presente trabalho em relação aos antimicrobianos sensíveis, relacionados com o hambúrguer misto que apresenta carne de frango na formulação, corroboram os achados de Cardoso et al. (2006), que ao pesquisarem 80 cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças de frango entre 1995 e 1996, verificaram que estas cepas não foram resistentes a gentamicina e a sulfazotrim.

Em relação ao tipo de hambúrguer e a sensibilidade das cepas de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos (**TABELA 17**), verificou-se que as cepas isoladas dos hambúrgueres de carne bovina (n=26) apresentaram sensibilidade ao cloranfenicol (100%), tetraciclina (96,15%), sulfazotrim (92,31%) e amicacina (80,77%) e resistência principalmente ao antimicrobiano cefotaxina (88,46%). Já os hambúrgueres mistos (carne bovina e carne de frango) (n=19) apresentaram maior sensibilidade a amicacina (89,47%) e sulfazotrim (89,47%) e resistência também a cefotaxina (89,47%).

**TABELA 17.** Frequência absoluta e relativa da sensibilidade das cepas de *Salmonella* spp. isoladas nos hambúrgueres de carne bovina e nos hambúrgueres misto, em relação aos 12 diferentes antimicrobianos testados.

Antimicrobiano ( $\mu\text{g}$ )	Hambúrguer de Carne Bovina (n=26)						Hambúrguer Misto (n=19) (Carne Bovina + Carne de Frango)					
	Sensível		Resistente		Intermediário		Sensível		Resistente		Intermediário	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Amicacina	21	80,77%	3	11,54%	2	7,69%	17	89,47%	1	5,26%	1	5,26%
Gentamicina	20	76,92%	4	15,38%	2	7,69%	15	78,95%	3	15,79%	1	5,26%
Ampicilina	7	26,92%	19	73,08%	0	0%	5	26,32%	13	68,42%	1	5,26%
Aztreonam	13	50,0%	7	26,92%	6	23,08%	7	36,84%	9	47,37%	3	15,79%
Cefalotina	6	23,08%	20	76,92%	0	0%	7	36,84%	11	57,89%	1	5,26%
Cefotaxina	1	3,85%	23	88,46%	2	7,69%	2	10,53%	17	89,47%	0	0%
Cefoxitina	11	42,31%	12	46,15%	3	11,54%	9	47,37%	10	52,63%	0	0%
Ceftazidima	6	23,08%	14	53,85%	6	23,08%	4	21,05%	5	26,32%	10	52,63%
Ceftriaxona	11	42,31%	14	53,85%	1	3,85%	7	36,84%	10	52,63%	2	10,53%
Cloranfenicol	26	100%	0	0%	0	0%	15	78,95%	4	21,05%	0	0%
Sulfazotrim	24	92,31%	1	3,85%	1	3,85%	17	89,47%	2	10,53%	0	0%
Tetraciclina	25	96,15%	0	0%	1	3,85%	11	57,89%	3	15,79%	5	26,32%

O teste de Student (teste *t*) para verificar se a porcentagem de cepas resistentes foram diferentes em relação aos tipos de hambúrgueres, com Grau de Liberdade igual a 11 teve como valor absoluto calculado igual a 0,9461 com  $p=0,3644$ . Sendo menor que os valores tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (3,11) e  $\alpha=0,05$  (2,20), indicando que não houve diferença entre o número de cepas resistentes em relação aos tipos de hambúrgueres.

Das 45 cepas de *Salmonella* spp. testadas aos 12 diferentes antimicrobianos, 42 (93,33%) tiveram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Porém, ao considerar que cepas com resultados intermediários são potencialmente resistentes e que cepas multirresistentes são aquelas que se apresentam com resistência a dois ou mais antimicrobianos, pode-se verificar que apenas três (6,67%) cepas apresentaram baixa resistência aos antimicrobianos, sendo uma (2,22%) cepa sensível a todos os antimicrobianos testados (cepa 19) e duas (4,44%) com resistência a apenas um antimicrobiano (cepas 12 e 21). Conseqüentemente, do total de cepas testadas ( $n=45$ ), 42 (93,33%) foram consideradas multirresistentes (**TABELA 18**). Sendo três (6,67%) cepas com resistência a dois antimicrobianos; três (6,67%) cepas resistentes a três antimicrobianos; cinco (11,11%) a quatro; sete (15,56%) a cinco; seis (13,33%) a seis; seis (13,33%) a sete; sete (15,56%) a oito; três (6,67%) a nove e duas (4,44%) cepas resistentes a dez diferentes antimicrobianos. Nenhuma cepa apresentou resistência a 11 ou a 12 diferentes antimicrobianos testados.

Os resultados intermediários podem ser considerados resistentes, pois de acordo com Cortez et al. (2006) o uso de antimicrobianos intermediários fariam seleções de cepas resistentes. Além disso, as cepas classificadas como intermediárias, podem promover o surgimento de cepas resistentes, caso sejam utilizados antimicrobianos com concentrações inferiores as recomendadas ou se a infecção ocorrer em local onde o antimicrobiano não alcance de forma efetiva e em grandes quantidades.

Capita et al. (2007), Dargatz et al. (2003) e Szych et al. (2001) classificaram como multirresistentes as cepas que são resistentes a dois ou mais agentes antimicrobianos, enquanto que para Wannaprasat et al. (2011) as cepas multirresistentes são aquelas resistentes a três ou mais agentes antimicrobianos. Entretanto para Castagna et al. (2001) cepas multirresistentes são aquelas resistentes a quatro ou mais antimicrobianos. Neste estudo optou-se em

considerar as cepas multirresistentes àquelas que foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos.

**TABELA 18.** Caracterização das 45 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de hambúrgueres de acordo com o tipo de hambúrguer, método microbiológico utilizado e perfil de resistência com a identificação dos antimicrobianos testados.

Cepas	Tipo de Hambúrguer	Método Microbiológico	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)	
			RESISTENTE	INTERMEDIÁRIO
1	Bov+Frango	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO/CRO	ATM/CAZ/ TET
2	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	-
3	Bov+Frango	Salmosyst	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO/CLO	TET
4	Bov+Frango	Convencional	ATM/CTX	-
5	Bov+Frango	Salmosyst	GEN/CFL/CTX	AMP/ATM/CAZ/TET
6	Bovino	Salmosyst	CFL/CTX/SUT	ATM/CAZ
7	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO	-
8	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	-
9	Bov+Frango	Salmosyst	CTX	CFL/CAZ
10	Bov+Frango	Convencional	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	AMI/TET
11	Bov+Frango	Salmosyst	AMI/GEN/ATM/CTX/CFO/CAZ/CRO/TET	-
12	Bov+Frango	Convencional	AMP	-
13	Bov+Frango	Convencional	CTX	CAZ
14	Bov+Frango	Convencional	CTX	GEN/ATM/CAZ/CRO
15	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CFO	CTX
16	Bovino	Convencional	AMI/AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	-
17	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	AMI/GEN/TET
18	Bovino	Convencional	ATM/CTX	-
19	Bovino	Convencional	-	-
20	Bovino	Convencional	-	ATM/CTX/CAZ
21	Bovino	Convencional	-	ATM
22	Bovino	Convencional	AMI/GEN/AMP/CFL/CTX/CAZ/CRO	-
23	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CTX/CAZ/CRO	-
24	Bovino	Convencional	GEN/AMP/ATM/CFL/CTX/CAZ/CRO	CFO
25	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CTX/CAZ/CRO	-
26	Bovino	Convencional	AMI/GEN/AMP/ATM/CFL/CTX	CFO/SUT
27	Bov+Frango	Convencional	GEN/AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	-
28	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO/CRO	CAZ
29	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ	-
30	Bov+Frango	Salmosyst	AMP/CTX	CAZ/CRO
31	Bov+Frango	Convencional	AMP/ATM/CFL/CTX/CRO	CAZ
32	Bovino	Convencional	AMP/ATM/CFL/CTX/CAZ/CRO	CFO
33	Bov+Frango	Salmosyst	AMP/CTX/CRO/CLO	-
34	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO/CRO	ATM/CAZ
35	Bovino	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ	ATM
36	Bov+Frango	Salmosyst	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	-
37	Bovino	Salmosyst	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	GEN
38	Bovino	Convencional	GEN/AMP/ATM/CFL/CTX/CAZ/CRO	AMI
39	Bovino	Salmosyst	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ/ CRO	-
40	Bov+Frango	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO	TET
41	Bovino	Convencional	CTX	ATM/CAZ
42	Bovino	Convencional	ATM/CTX	CAZ/CRO
43	Bov+Frango	Convencional	AMP/CFL/CTX/CFO	CAZ
44	Bov+Frango	Salmosyst	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CRO/CLO/SUT/TET	CAZ
45	Bov+Frango	Salmosyst	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CRO/CLO/SUT/TET	CAZ

Legenda: AMI Amicacina; GEN Gentamicina; AMP Ampicilina; ATM Aztreonam; CFL Cefalotina; CTX Cefotaxina; CFO Cefoxitina; CAZ Ceftazidima; CRO Ceftriaxona; CLO Cloranfenicol; SUT Sulfazotrim; TET Tetraciclina.

Com frequência menor que a detectada neste trabalho, Szych et al. (2001) observaram que um total de 49,4% de cepas de *Salmonella* Enterica isoladas de fezes de pacientes com diarreia e portadores, foram resistentes a dois ou mais agentes antimicrobianos. Contudo Dagartz et al. (2003) testaram

702 cepas e encontraram 11,7% de cepas multirresistentes, sendo que a resistência mais comum ocorreu a tetraciclina (35,9%). Menor percentual de cepas foi resistente a ampicilina (10,4%) e cloranfenicol (10,4%) e nenhuma cepa foi resistente a amicacina e a gentamicina. Frequência menor que a detectada por Castagna et al. (2001) que avaliaram a resistência a antimicrobianos de 99 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de suínos, onde apenas 24 (24,24%) cepas foram multirresistentes. Porém, destaca-se que estes autores classificaram as cepas de multirresistentes quando estas eram resistentes a quatro ou mais antimicrobianos.

Com classificação diferente quanto as cepas multirresistentes (resistência a pelo menos três diferentes agentes antimicrobianos), Wannaprasat et al. (2011) ao avaliarem 162 cepas de *Salmonella* spp. verificaram que 89% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano e que 63% foram multirresistentes. Porém, contrariando os resultados desta presente pesquisa, foi observado com mais frequência a resistência a tetraciclina (74%) e nenhuma das cepas foi resistente a ceftriaxona.

Alvarez-Fernández et al. (2012) observaram 100% de resistência múltipla em todas as cepas testadas, neste caso, a três ou mais antimicrobianos. As 40 cepas isoladas de *Salmonella* spp. em 1993, foram resistentes a três (25%), quatro (52,5%) ou cinco (22,5%) antimicrobianos, enquanto que as 19 cepas obtidas em 2006 foram resistentes a três (26,3%), quatro (26,3%), cinco (10,5%), seis (26,3%), sete (5,3%) e 13 (5,3%) diferentes antimicrobianos. Enquanto que Cortez et al. (2006) observaram que sete (24,14%), das 29 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouro aviário, apresentaram resistência a sete antimicrobianos, seis (20,7%) a oito e quatro (13,8%) a cinco. Nenhuma das cepas analisadas foi resistente aos 11 e aos 12 princípios ativos testados.

Lynne et al. (2009) examinaram três diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. quanto a resistência aos antimicrobianos e encontraram cepas de *Salmonella* Dublin com maior percentagem de resistência, com 80% de cepas isoladas resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos testados e 64% resistentes a seis ou mais antimicrobianos. A resistência em isolados de *Salmonella* Choleraesuis também foi elevada com 87,5% resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 37,5% resistentes a pelo menos quatro. Na *Salmonella* Pullorum foi encontrada a menor quantidade de resistência, com 55,5% dos isolados resistentes a um único antimicrobiano. Em geral, a

resistência foi mais comumente observado para tetraciclina (64,3%) e todos os isolados foram sensíveis a amicacina. Resultados diferentes de Souza et al. (2010), que das 44 cepas de *Salmonella* Typhi identificadas no estado do Pará, Brasil, dez (22,7%) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano.

Ribeiro et al. (2008) encontraram frequência mais próxima a verificada no presente trabalho, onde de um total de 79 cepas de *Salmonella* Enteritidis, isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes, 65 (82,3%) foram resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos. Dentre as 65 cepas resistentes, 43 (66,1%) foram resistentes a dois ou mais agentes antimicrobianos e 22 (33,8%) a somente um, sendo estas frequências muito maiores as encontradas neste trabalho. Além disso, de forma totalmente antagônica, a resistência à tetraciclina foi observada em 53 (67,1%) cepas. Este alto percentual de resistência a tetraciclina (67%), também foi verificado por Zimermann et al. (2008) ao testarem 33 cepas de *Salmonella* Hadar isoladas de carcaças de frango.

Também Graziani et al. (2008), em pesquisa com cepas de *Salmonella* Typhimurium isoladas na Itália no período 2002-2004, a partir de fontes humanas e de outros animais, quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, verificaram que cerca de 87% das cepas isoladas de infecções humanas e 81% de fontes de outros animais foram resistentes a pelo menos a um dos antimicrobianos testados, sendo que a maior frequência de resistência foi para ampicilina (67,6%), tetraciclina (73,6%) e cloranfenicol (32,3%).

Um dos fatores mais proeminentes que podem causar essa alta taxa de resistência é o uso indiscriminado de antimicrobianos de forma empírica e a automedicação e/ou medicação profissional sem uma prévia investigação para o diagnóstico laboratorial adequado, seja pela falta de estrutura e condições, seja por desinformação e/ou negligência por parte dos profissionais de saúde (Souza et al., 2010).

Segundo o artigo 18 da Instrução Normativa (IN) nº 26 (Brasil, 2009), tanto as tetraciclinas quanto as sulfonamidas sistêmicas são de uso exclusivo em produtos antimicrobianos de uso veterinário, sendo vetada a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais. Além disso, de acordo com o descrito na IN nº 9 (Brasil, 2003), é proibida a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso do cloranfenicol para uso veterinário e

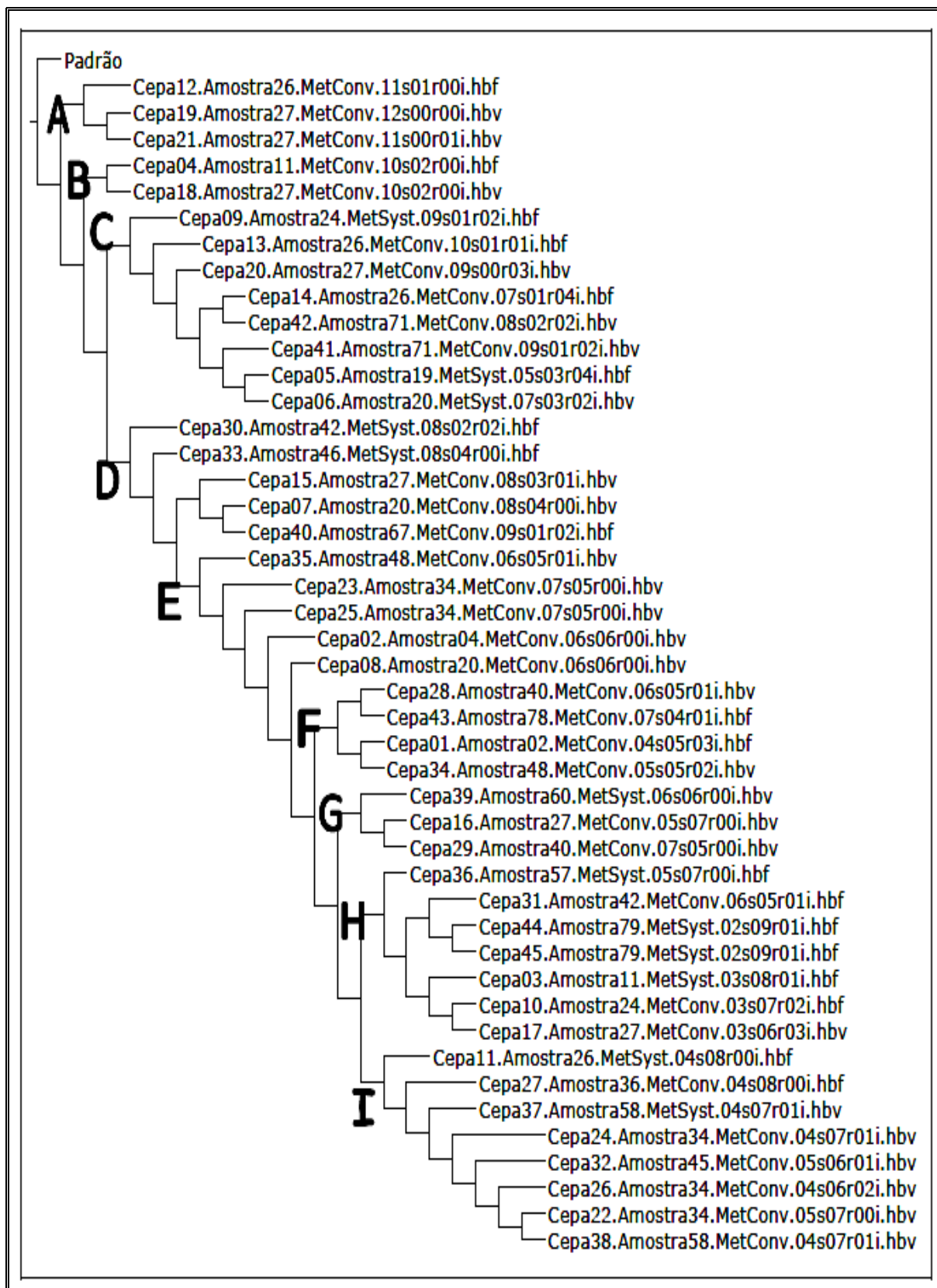


suscetível de emprego na alimentação de todos os animais. Talvez, devido ao respeito, por parte dos criadores e médicos veterinários, a estas duas normatizações, a maioria das cepas testadas encontrou-se sensível aos antimicrobianos cloranfenicol, sulfazotrim e tetraciclina. Porém foi possível observar que provavelmente tais antimicrobianos podem estar sendo utilizados de forma indiscriminada na produção de aves de corte, pois foram identificadas cepas resistentes a estes mesmos antimicrobianos nos hambúrgueres mistos, que apresentam carne de frango na sua formulação.

Na formação do cladograma, pela análise de similaridade, observou-se certa heterogeneidade entre as cepas. Porém, mesmo assim, foi possível identificar várias cepas com similaridade entre os isolados, formando nove diferentes grupos que foram identificados pelas letras A, B, C, D, E, F, G, H e I (**FIGURA 22**). Além disso, percebeu-se que o grupo A foi formado somente pelas cepas consideradas sensíveis, enquanto que nos outros grupos (B-I) encontram-se as cepas classificadas como multirresistentes.

Importante observar que quando os grupos de cepas foram formados no cladograma por similaridade, verificou-se que algumas cepas originárias de amostras e tipos de hambúrgueres (bovino e misto) totalmente diferentes entre si, foram classificadas como cepas semelhantes (similares), tais como exemplos as cepas 04 e 18 (grupo B) e as cepas 28, 43, 01 e 34 (grupo F). De maneira contrária também foi possível verificar cepas com diferentes características, mas originárias da mesma amostra, sendo classificadas em grupos diferentes, conforme, por exemplo, as cepas das amostras 26 e 27 (**FIGURA 22**).

Magalhães et al. (2005) afirmaram que caso exista uma relação epidemiológica entre microrganismos idênticos, pode-se afirmar a presença de um surto. Porém, quando microrganismos de mesma espécie com características semelhantes são isolados de amostras que não possuem uma ligação epidemiológica detectável, pode-se afirmar que se tratam de linhagens endêmicas. Importante salientar que, microrganismos envolvidos em um surto e/ou epidemias devem apresentar padrões semelhantes, enquanto que, aqueles não envolvidos com surto e/ou epidemias devem apresentar padrões distintos.



**FIGURA 22.** Cladograma de similaridade entre as cepas de *Salmonella* spp. isoladas de hambúrgueres de carne bovina e hambúrgueres mistos (carne bovina e carne de frango), produzido pelo programa *WinClada*<sup>®</sup>.

Legenda: MetConv (Método Convencional); MetSyst (Método Salmosyst); s (sensível); r (resistente); i (intermediário); hbv (hambúrguer bovino); hbf (hambúrguer misto – carne bovina e carne de frango).

### 3.3 ARTIGOS

A partir desta pesquisa foram produzidos os seguintes artigos científicos:

1. FORTUNA, J. L.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M. Detection of *Salmonella* spp. in hamburgers: a comparison between modified standard and Salmosyst methods. *Internet Journal of Food Safety*. v. 14, p. 104-112. 2012. (ISSN 1930-0670 from Library Congress National Serials Data Program. Operated by FoodHACCP.com). **(PUBLICADO)**.
2. FORTUNA, J. L.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M. Pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus através da reação em cadeia da polimerase a partir de caldo de pré-enriquecimento. *Arquivos do Instituto Biológico*. (QUALIS B2 - ISSN 0020-3653). **(ENVIADO E AGUARDANDO AVALIAÇÃO)**.
3. FORTUNA, J. L.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M. Conventional microbiology, Salmosyst method and polymerase chain reaction: a comparison in the detection of *Salmonella* spp. in raw hamburgers. *Brazilian Journal of Biology*. (QUALIS B1 - ISSN 1519-6984). **(ENVIADO E AGUARDANDO AVALIAÇÃO)**.
4. FORTUNA, J. L.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M. Comparação entre a sorologia e o sistema BacTray<sup>®</sup> na identificação de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus. *Revista Higiene Alimentar (Encarte Eletrônico)*. v. 27, n. 218/219, n. p. 2013. (QUALIS B3 - ISSN 0101-9171). **(PUBLICADO)**.
5. FORTUNA, J. L.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em hambúrgueres crus e suas respectivas temperaturas de armazenamento. *Revista Alimentos e Nutrição*. (QUALIS B3 - ISSN 0103-4235). **(ENVIADO E AGUARDANDO AVALIAÇÃO)**.
6. FORTUNA, J. L.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M. Correlação entre contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. v. 20, n. 1, p. 59-63. 2013. (QUALIS B3 - ISSN 1413-0130). **(PUBLICADO)**.
7. FORTUNA, J. L.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. strains isolated from hamburgers. *African Journal of Microbiology Research*. v. 6, n. 49, p. 7525-7533. 2012. (QUALIS B1 - ISSN 1996-0808). **(PUBLICADO)**.

## Detection of *Salmonella* spp. in Hamburgers: a Comparison Between Modified Standard and Salmosyst Methods

Jorge Luiz Fortuna<sup>1,\*</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>2</sup>, Robson Maia Franco<sup>2</sup>

<sup>a</sup>Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Laboratório de Microbiologia. Campus X. Curso de Ciências Biológicas. Av. Kaikan, s/n – Universitário. Teixeira de Freitas-BA. CEP: 45.995-300. Brazil; e-mail: [jfortuna@uneb.br](mailto:jfortuna@uneb.br)

<sup>b</sup>Universidade Federal Fluminense (UFF). Programa de Pós-Graduação (Doutorado) em Higiene e Processamento de Produtos de Origem Animal. Faculdade de Veterinária. Niterói, RJ, Brazil.

---

### Abstract

*Salmonella* spp. was analyzed in beef and chicken and in beef hamburgers using two different microbiological methods with slight modifications in the biochemical test stage. Of the 80 hamburger samples analyzed, 22 (27.5%) were positive for *Salmonella* spp., 10 (12.5%) beef and 12 (15%) chicken and beef hamburgers. Of the 22 positive samples, 11 (50.0%) were detected by the standard method alone, 5 (22.73%) by the Salmosyst method, and 6 (27.27%) were detected using both methods. Sensitivity and specificity of methods was investigated. The standard method was the most effective to identify real positive results, while Salmosyst method afforded to characterize real negative results. As for accuracy, both methods were acceptable to analyze *Salmonella* spp. in hamburgers. The importance of streaking *Salmonella* spp. colonies obtained using the TSI and LIA agars, with atypical characteristics 1 and 2 was also revealed, since these two sets of characteristics may be used to isolate atypical *Salmonella* spp. serotypes, which ferments lactose and *Salmonella* Paratyphi, which does not decarboxylate lysine, respectively. Secondary screening was efficient as regards the differentiation between *Proteus* spp. and *Salmonella* spp. colonies.

**Key words:** *Salmonella*; Hamburger; Standard Method; Salmosyst Method.

---

### Introduction

Food poisoning outbreaks pose a challenge to the food industry and health authorities, and in this sense the genus *Salmonella* stands as one of the most important and common foodborne pathogenic bacteria (Siqueira et al., 2003). These microorganisms invade the intestinal tract mucosa, and are transmitted to humans through contaminated water, meat, eggs and poultry products via the fecal-oral pathway. More specifically, food poisoning caused by *Salmonella* spp. is termed salmonellosis, a disease with considerable social impact and that is held responsible for an array of different kinds of economic losses worldwide (Giombelli and Silva, 2002).

Salmonellosis may be caused by any of the almost 2,500 *Salmonella* serotypes known. It is the most ancient and common form of food poisoning, with total mortality rates that may reach 0.2% (Gooding and Choudary, 1999; Gutiérrez-Cogco et al., 2000; Oliveira et al., 2003). Additionally, it is the most prevalent disease transmitted to humans from animals (D'Aoust, 1991; Ferretti et al., 2001; Kwang et al., 1996; Riyaz-UI-Hassan et al., 2004). It has been reported that the disease starts when food or water contaminated with sufficiently high bacteria counts are ingested, resulting in the colonization of the small intestine (Van Pouke, 1990). The main clinical signs of salmonellosis include acute gastroenteritis, bacteremia with or without extraintestinal infection, and fever, though asymptomatic carriers are also reported.

*Salmonella* spp. is detected mainly in animal food products, among which hamburgers, prepared with beef alone or as a combination of beef and chicken. The

---

\* Corresponding author. mailing address:  
Email: [jfortuna@uneb.br](mailto:jfortuna@uneb.br)

hamburger is an extensively industrialized meat product consumed largely because of ease of preparation and excellent sensory characteristics. The main raw material is minced beef, though fat and other ingredients may be included. Intensive handling and complex preservation issues in preparation promote pathogen growth and transmission in hamburgers. High probabilities of some kind of contamination have been observed throughout the hamburger production process. This contamination may be caused by a variety of agents, such as specific organic compounds used in pastures, management techniques, transportation of animals, inappropriate slaughter procedures (contamination in carcasses), apart from problems in handling, storing and even in preparation and consumption.

In this sense, microbiological assessment of hygiene and sanitation procedures in hamburger production becomes necessary to warrant safe and contamination-free consumption. Techniques developed to evaluate bacterial contamination in the food production chain, more specifically of animal origin, aims mostly at reducing risks of foodborne diseases and testing the quality of these products. The detection and characterization of *Salmonella* spp. in foods and water is very important in the control and prevention of food poisoning outbreaks. However, concerning health inspection routines, which require fast and reliable results so as to issue approval certificates for commercialization and consumption, standard methodologies to evaluate *Salmonella* spp. in foods based on classical culture media are time-consuming and impractical. As a rule, standard microbiological techniques require between 5 and 7 days of laboratory work, especially when a large number of samples has to be processed, as observed in the food industry. These methods are also prone to producing false negative results, mainly due to the interference of other microorganisms in food samples that are direct competitors with *Salmonella* spp. bacterial cells.

In spite of these apparent disadvantages, these techniques remain as the most used, and are the reference methodology officially recommended in the Brazilian legislation on the subject. Concerning the specific regulation on hamburger origin and quality, Ordinance N<sup>o</sup>. 20 (Brasil, 2000) established that the current legislation is to be enforced concerning microbiological contamination criteria. Microbiological contamination thresholds and standards for hamburgers defined in Resolution N<sup>o</sup>. 12, issued by the Board of the National Sanitation Authority (ANVISA) (Brasil, 2001) establish that indicative or representative food samples must be free of *Salmonella* spp. bacterial cells.

In this scenario, the main goal of present study was to investigate the presence of *Salmonella* spp. in beef hamburgers and combined beef and chicken meat hamburgers sold in the city of Niterói, state of Rio de Janeiro, RJ, Brazil, using modified versions of the standard microbiological methodology and the Salmosyst method.

### **Investigation of *Salmonella* spp. using the standard methodology**

The standard *Salmonella* spp. detection method for foods was developed to investigate the presence of the pathogen, even in extremely unfavorable conditions, as in foods hosting a competing microbiota that overwhelms *Salmonella* spp. population and in items in which the pathogen's cells are injured or stressed by conservation strategies like heat, freezing and/or drying. Variations in choice of culture media and sample preparation routines are observed, though essentially four steps are applicable in the analysis of any kind of food: pre-enrichment in non-selective broth; enrichment in selective broth; differential selective plating (isolation and selection); confirmation (biochemical identification and seroagglutination test) (Brasil, 2003).

In general, these stages include pre-enrichment, which promotes the regeneration and the multiplication of injured *Salmonella* spp. cells, the selective enrichment to increase the ratio of *Salmonella* spp. cells to competing microorganisms, and selective/differential plating to allow the identification and isolation of *Salmonella* spp. colonies by suppressing the growth of the competing microbiota. Biochemical and serological confirmation is required whenever typical *Salmonella* spp. colonies grow in selective/differential media. In theory, the detection threshold of these methods is one *Salmonella* spp. cell in a 25 g food sample, though detection may be hampered by the presence of competing microorganisms during enrichment (Beckers et al., 1987; Blackburn, 1993; Fricker, 1987).

#### **PRE-ENRICHMENT IN NON-SELECTIVE BROTH**

In this step, a 25 mL sample is inoculated at 36°C for 16 to 20 h in 225 mL Buffered Saline Peptone Solution (BSPS) or Buffered Peptone Water (BPW). This procedure minimizes the effects of the industrial processing of foods, which causes stress to *Salmonella* spp. cells without biologically inactivating them. Also, BSPS or BPW help maintain pH, preventing acidification of the medium by other bacteria present, a condition that hampers the recovery of *Salmonella* spp. (Brasil, 2003).

Isolation of *Salmonella* spp. is influenced mainly by the presence of competing microorganisms. Nevertheless, the competing microbiota is not representative of the same microbiota actually occurring in foods. By adding the reference material to a mixture of BPW and the food being analyzed, before incubation, the competing microorganisms naturally present in the sample may be used (Beckers et al., 1985). These investigation procedures usually include the pre-enrichment of a food sample in a non-selective medium to facilitate and allow the repair of stressed or injured *Salmonella* spp. cells, commonly detected in raw as well as in processed foods. These cells may then multiply. Growth should afford sufficiently high counts of these microorganisms, in an attempt to warrant survival in a

highly selective medium used in the next step (D'Aoust et al., 1992; Van Schothorst and Renaud, 1985).

#### **ENRICHMENT IN SELECTIVE BROTH**

This step is carried out at 41°C for 24 to 30 h, in culture media containing substances that prevent the growth of most competing microorganisms. The selective media used are the Rappaport-Vassiliadis Broth (RV) medium and the Selenite-Cystine Broth (SC), though Tetrathionate Broth (TT) is occasionally employed. In the RV Broth, malachite green and magnesium chloride, in an appropriate temperature, act as selective agents on the competing microbiota, while soy peptone stimulates *Salmonella* spp. growth. As for the SC Broth, sodium selenite inhibits coliforms and enterococci, while TT Broth selectiveness is indicated by tetrathionate and brilliant green (Brasil, 2003).

Busse (1995) reports that these selective enrichment media in general are used to suppress the accompanying microbiota as well as Gram-positive bacteria. The selective media for *Salmonella* spp. are totally efficient, among which the most commonly used are the selenite broth, tetrathionate broth with brilliant green, bile green or malachite green combined with high amounts of magnesium chloride. Patil and Parhad (1986), apart from confirming that enrichment media play an important role in the isolation of *Salmonella* spp., since usually the populations of this microorganisms are smaller compared to other bacteria, also stress the fact that enrichment media were initially developed to isolate *Salmonella* spp. in feces, and were later used in the analyses of other materials, like food and water.

However, Busse (1995) warns that the isolation of *Salmonella* spp. in foods is somewhat prone to failure. The main risk lies in faulty sampling procedures, since bacterial cells initially present in a sample may be lost during enrichment. If *Salmonella* spp. are the prevailing microorganisms in the enrichment broth, detection will always be successful. Nevertheless, if populations of competing microorganisms overwhelm *Salmonella* spp. counts, then detection may not succeed.

#### **DIFFERENTIAL SELECTIVE PLATING (ISOLATION AND SELECTION)**

In this step, *Salmonella* spp. colonies are isolated using at least two of the following solid selective media: (i) Brilliant-Green Phenol-Red Lactose Sucrose Agar (BPLS); (ii) Rambach Agar (RA); (iii) Differential Salmonella Agar (DSA); (iv) Hektoen Enteric Agar (HE); (v) *Salmonella-Shigella* Agar (SS); Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD); Xylose-Lysine Tergitol 4 Agar (XLT4); Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green Agar (MLCB). In BPLS, novobiocin is added to inhibit mainly *Proteus* spp., while bovine bile, a stain derived from triphenyl methane (brilliant green) inhibits Gram-positive bacteria. In RA, differentiation between *Salmonella* spp. and other microorganisms is due to the presence of propylene glycol and a chromogen that indicates the hydrolysis of beta-

galactosidase. In MLCB, magnesium ions promote the growth of *Salmonella* spp., while brilliant green inhibits the accompanying microbiota (Brasil, 2003).

The choice of a selective plating medium is object of special attention. Appropriate plating media are essential for the efficient isolation of all bacteria, which should grow on solid media. Efficient plating media should exhibit a variety of characteristics, like supporting the growth of a wide array of specific microorganisms, while inhibiting the growth of other bacteria, as far as possible. Apart from this, these media should afford to distinguish the organisms being investigated from those that may also establish colonies in the same media. Additionally, efficient differentiation not only increases the rates of success in isolation, but also reduces the number of colonies that have to be characterized using biochemical and physiological methods to confirm the presence of the microorganism studied (Fricker, 1987).

#### **BIOCHEMICAL IDENTIFICATION**

Suspected *Salmonella* spp. colonies are screened in media that provide indications of the biochemical characteristics of the microorganisms. The media used are: (i) Triple Sugar Iron Agar (TSI); (ii) Lysine Iron Agar (LIA); (iii) Kligler Iron Agar (KIA) (Siqueira, 1995).

#### **COMPLEMENTARY BIOCHEMICAL TESTS**

These tests provide evidence of the physiological and metabolic properties of suspected colonies, among which: (i) presence of cytochrome oxidase; (ii) urease production; (iii) glucose fermentation; (iv) saccharose and lactose detection in TSI; (v) beta-galactosidase detection; (vi) lysine decarboxylation; (vii) sulfide production (H<sub>2</sub>S); (viii) motility; and (ix) indol production. The following culture media are used: (i) Urea Broth; (ii) SIM medium; (iii) oxidase test; (iv) Phenylalanine Agar; (v) VM-VP Broth; and (vi) Citrate Agar (Brasil, 2003).

#### **SEROAGGLUTINATION TEST (SEROLOGY)**

This test is based on the antigen-antibody reaction, which caused antigen agglutination by antiserum for polyvalent *Salmonella* spp. (Brasil, 2003).

#### **Chromogenic media to detect *Salmonella* spp.**

According to Reis and Camargo (2008), chromogenic media are used to differentiate and isolate *Salmonella* spp. from other genera and also other numerous species. It has been published that standard methods to detect *Salmonella* spp. suffer from poor specificity and therefore leads to a considerable number of false positive results (which include the detection of *Citrobacter* spp. and *Proteus* spp.) among very few positive results for *Salmonella* spp. (Manafi, 2000). Since these labor-intensive techniques may often produce false results in routine laboratory analysis, new chromogenic and fluorogenic methods that lead to faster

and more reliable *Salmonella* spp. detection become necessary.

These methods may be used directly after primary growth, abolishing the need for long procedures of isolation and identification. By using synthetic substrates it becomes possible to conduct several reactions simultaneously in one same dish. Chromophore and/or fluorophore groups are associated to different types of protein, glycoside, and alcohol substrates, among others which, compared to standard media, are responsible for the greater detection accuracy exhibited by chromogenic and fluorogenic media (Bascombs, 1987; Manafi et al., 1991; Manafi et al., 1996; Tsoraeva and Marques, 2005).

Acknowledging the limitations in the use of phenotypic characteristics currently used to detect *Salmonella* spp., Rambach (1990) developed a medium to presumptively detect these microorganisms, differentiating *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. The method also allows the identification of colonies of bacteria of the Enterobacteriaceae family. Additionally, *Salmonella* spp. are distinctively stained, facilitating the recognition of colonies of other microorganisms.

Rambach (1990) reports a new phenotypic characteristic: the production of acid from ethylene glycol. This parameter may be used instead of H<sub>2</sub>S production to identify *Salmonella* spp. in selective media. Organisms that use lactose were then identified based on a chromogenic indicator of beta-galactosidase, discriminating *Salmonella* spp. from members of the Enterobacteriaceae family that also use this enzyme. Desoxycholate was included as an inhibitor of Gram-positive bacteria, though not every compound was used at the concentrations that usually do not inhibit pathogenic microorganisms and coliforms.

A chromogenic medium relies on the ability of *Salmonella* spp. to produce acid from propylene glycol, which differentiates these species from other enteric bacteria. Apart from this, the presence of the chromogenic substrate X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) affords to detect the production of beta-galactosidase D produced by another enterobacterium. *Salmonella* spp. cultures are positive only in the first reaction (acid production from propylene glycol). These colonies are brilliant red in color, while *Escherichia coli* and other coliforms are positive only for beta-galactosidase D, and form blue colonies. *Proteus* spp. are negative for both reactions and therefore its colonies are transparent. *Citrobacter* spp. form violet colonies due to the combination of colors (red and blue), since the two reactions are observed (Garrick and Smith, 1994; Pignato et al., 1995). Manafi (1996; 2000) also stated that chromogenic substrates of the enzyme are the compounds that act as substrate to specific enzymes and change color due to the action of this same enzyme. Generally speaking, four groups of chromogenic compounds are described, based on the chemical reaction they participate in: indol compounds (soluble in water and thermostable), and the

most commonly used compounds, like 5-bromo-4-chloro-indolyl (colorless), 5-bromo-6-chloro-3-indolyl (magenta) and 6-chloro-3 indolyl (salmon pink), which do not diffuse in agar plates.

The ability to detect the presence of a specific and exclusive enzyme using appropriate substrates, more specifically the chromogenic and fluorogenic enzyme substrates, has led to the development of a large number of methods to identify microorganisms, even in media used for preliminary isolation. The addition of these substrates to a selective medium may abolish the need for subculture, affording to use biochemical tests to establish the identity of determined microorganisms (Manafi, 2000).

### ***Salmonella* spp. detection using the Salmosyst method**

The Salmosyst method is a double enrichment method consisting of a pre-enrichment stage in non-selective Salmosyst Broth Base (SYBB) containing only nutrients, electrolytes and buffers that regulate pH. In the enrichment stage, selective agents are added as Salmosyst selective supplement tablets, which dissolve gradually during 30 min, producing a selective gradient in the medium and allowing a progressive adaptation of *Salmonella* spp. cells to the medium, and increasing survival rates of these cells (Fierens and Huyghebaert, 1996).

After the enrichment stage, a selective and differential chromogenic agar medium is used to distinguish *Salmonella* spp. from other enteric bacteria. This medium is prepared mainly with propylene glycol, sodium desoxycholate, neutral red (as a pH indicator) and a chromogenic substrate for beta-galactosidase. The differentiation between bacteria is based on the production of acid from propylene glycol by *Salmonella* spp. and/or beta-galactosidase activity (Fierens and Huyghebaert, 1996; Rambach, 1990). The pink or red colonies obtained in the chromogenic agar medium are then identified using biochemical and serological methods (Pignato et al., 1995).

## **Material and Methods**

### **Study area and sample collection**

This study was conducted in the Laboratory of Microbiological Control of Animal Products, Department of Food Technology, Veterinary Medicine School, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Eighty samples of hamburgers prepared with beef alone (n=40) or as a combination of beef and chicken (n=40) were randomly purchased as routinely commercialized in double or single polypropylene bags by local supermarkets or butchers' shops in the city of Niterói, RJ, Brazil, between May and December, 2011. Four hamburgers were considered a whole sample. All hamburgers were certified by the federal inspection authority of Brazil (SIF). Hamburgers weighed between 56 g and 120 g. As of purchase, hamburgers were kept in the original package, which were placed in individual low-

density polyethylene bags with hermetic lock, transferred to a portable thermal container and transported to the laboratory for analyses.

### ***Salmonella* spp analysis**

The microbiological methods used to isolate and identify *Salmonella* spp. were those defined in Ordinance N° 62, issued by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supplies (MAPA), Office for the Protection of Agriculture and Livestock (SDA), which publishes the official analytical methods used in the microbiological analyses of animal products and water (Brasil, 2003).

The results of *Salmonella* spp. analyses obtained were compared to the national standard, based on Resolution N° 12, issued by the Board of the National Sanitation Authority (ANVISA), Ministry of Health (Brasil, 2001). These standards define sanitary and microbiological thresholds for foods, and determine the criteria to be adopted in the interpretation of results of microbiological analyses of foods for human consumption (Brasil, 2001).

### **Standard microbiology**

In the laboratory, a sample was defined as a 25 g aliquot was retrieved from a hamburger sample. For pre-enrichment, samples were placed in a plastic bag and weighed in a digital precision scale. Then, 225 mL of BSPS 1% were added and the mixture was homogenized in a stomacher for 60 s at normal speed. The bag containing the sample was hermetically closed and left at room temperature for 1 h. After, bags were placed in a stove, where samples were incubated at 36°C for 16 to 20 h.

For enrichment, samples were inoculated with SC and TT broths. Aliquots of 1 mL were individually transferred to tubes containing 10 mL of each broth, and were inoculated at 41°C for 24 to 30 h.

Selective plating was carried out using the selective enrichment broths. Selective media were streaked on dry Petri dishes using a bacteriological loop so as to produce isolated CFU. Two dishes were used for each culture medium (one culture from SC and one from TT), which were: HE, SS, XLD and DSA. All dishes were incubated in a stove at 36°C for 18 to 24 h.

During screening, here called initial screening, up to typical 3 CFU were chosen from each Petri dish used in selective plating. These CFU were streaked onto two different tubes, one containing TSI and the other containing LIA. Tubes were incubated in a stove at 36°C for 24 to 30 h. After incubation, TSA and LIA tubes were inspected for typical *Salmonella* spp. characteristics, with or without H<sub>2</sub>S production. The expected phenotypical characteristics observed were: acid bottom (yellow) and alkaline slant (red) in TSI, and alkaline bottom and slant (purple) in LIA. The first set of atypical characteristics in TSI/LIA were: TSI with acid bottom and slant (yellow), and LIA with acid bottom (yellow) and alkaline slant (purple). In turn, the second set of atypical characteristics in TSI/LIA were: TSI

with acid bottom (yellow) and alkaline slant (red), and LIA with acid bottom (yellow) and alkaline slant (purple). TSI tubes presenting acid bottom and slant (yellow) and LIA tubes with acid bottom (yellow) and alkaline slant (purple) were excluded.

This initial screening of typical and atypical *Salmonella* spp. characteristics was used in the secondary screening (complementary biochemical tests). Using a bacteriological loop, colonies were streaked in tubes containing culture media that revealed physiological and metabolic properties of suspected *Salmonella* spp. colonies by assessing urease production (Urea Broth) and phenylalanine deamination (Phenylalanine Agar). This stage was important in order to differentiate *Proteus* spp. cells, which produce positive urease results (i.e., hydrolyze urea) and deaminate phenylalanine, from *Salmonella* spp. cells.

In the urease production assay, colonies were massively seeded in test tubes containing 3.0 mL Urea Broth and were then incubated at 36°C for 24 to 30 h. Colonies that retained their initial color indicated that urea hydrolysis did not occur. Change in color to pink showed the alkalization of the medium due to the action of urease over urea, since *Salmonella* spp. do not produce urease. In the phenylalanine deamination test, the slant surface of the Phenylalanine Agar was streaked and incubated at 36°C for 18 to 24 h. Then, 2 to 3 drops of ferrous chloride 10% were added. Phenylalanine deamination was indicated by a green color on the slant, since *Salmonella* spp. do not deaminate phenylalanine.

Based on the negative results of the urease and deamination tests, typical of *Salmonella* spp. cells, the corresponding colonies grown in TSI tubes were streaked onto slanted tubes containing nutrient agar and incubated at 36°C for 18 to 24 h. After, the growth obtained was resuspended in approximately 2.0 mL saline 0.85%. Next, one drop of saline 2% and then one drop of polyvalent anti-*Salmonella* serum were laid on two glass slides, straight from the container. One drop of the test solution was added to each slide. Reactions were observed by spinning slides gently over a black background for 1 to 2 min. Positive results for *Salmonella* spp. were defined by the presence of agglutination only in the slides containing bacterial growth and antiserum. Negative results were defined as the absence of any agglutination in both slides, and non-specific reaction was observed as agglutination in both slides.

Apart from this, at each stage of the microbiological analysis (standard and Salmosyst methods), aliquots of broths and colonies in plates and tubes were transferred to glass slides using a microbiological loop for staining smear according to Gram's method (morphostaining characteristics) to detect Gram-negative rods under an optical microscope equipped with an immersion objective lens.

### ***Salmonella* spp. detection using the Salmosyst metho**



A 25 g aliquot was retrieved from a hamburger sample and placed in a plastic bag. This sample was weighed in a digital precision scale. Then, 225 mL of Salmosyst Broth Base (SYBB) for pre-enrichment was added and the mixture was homogenized in a stomacher for 60 s at normal speed. The bag was hermetically closed and left to stand at room temperature for 1 h. Then, samples were incubated in a stove at 35°C for 6 h. Selective enrichment was carried out transferring 10 mL of SYBB to test tubes containing 10 mL of the Selective Supplement. This selective medium was incubated at 35°C for 18 h. After incubation, it was streaked on DSA and incubated again at 35°C for 18 h. Pink and red colonies were submitted to biochemical and serological investigation, as described in standard methodologies.

### Statistical analyses

A transversal observational analytical evaluation of data was carried out. Data were expressed and analyzed as absolute and percent frequencies. Additionally, the chi-square test ( $\chi^2$ ), the McNemar test and diagnostic tests were executed using the statistical software *BioStat*™ 3.0, version 2003.

The statistical analysis of significance of the differences observed in results of microbiological analysis (standard microbiology and Salmosyst method) was carried out using the chi-square ( $\chi^2$ ) test at 95% significance ( $\alpha = 0.05$ ) and 99% ( $\alpha = 0.01$ ). Results of *Salmonella* spp. in hamburgers by standard methods were compared with the results by the Salmosyst method using the McNemar test. Sensitivity, specificity and accuracy of results of standard and Salmosyst methods were evaluated using diagnostic tests.

## Results

Of the 80 samples of hamburgers analyzed (40 pure beef and 40 beef and chicken hamburgers), which were all inspected by the federal inspection authority of Brazil (SIF), 22 (27.5%) were contaminated by *Salmonella* spp. and were thus considered inappropriate for human consumption (according to Resolution N°. 12, issued by the Board of the National Sanitation Authority (ANVISA) (Brasil, 2001).

Of the 22 *Salmonella* spp. positive samples (Tab. 1), 10 (12.5%) were pure beef and 12 (15%) were beef and chicken hamburgers.

**Table 1.** *Salmonella* spp. detected in beef and chicken and beef hamburger samples.

Type of hamburger	<i>Salmonella</i> spp.		TOTAL
	Positive	Negative	
Beef	10	30	<b>40</b>
Chicken and beef	12	28	<b>40</b>

TOTAL	22 (27.5%)	58 (72.5%)	80 (100%)
-------	------------	------------	-----------

The value obtained in the chi-square ( $\chi^2$ ) test, used to assess the relationship between type of hamburger and *Salmonella* spp. prevalence using both methods, was 2.71, with  $p=0.4386$  (df=3). Since this value was lower than values considering significance levels  $\alpha=0.01$  (11.34) and  $\alpha=0.05$  (7.81), showing that the differences were non-significant. In other words, the differences observed were not related to the analytical methods employed to analyze either hamburger type (pure beef and chicken and beef hamburger).

However, considering the parameter type of meat used in hamburger preparation, it was observed that among the 40 beef hamburger samples, 10 (12.5%) were positive for *Salmonella* spp., and of the 40 chicken and beef hamburgers, 12 (30.0%) were contaminated with *Salmonella* spp.

The value calculated in the chi-square ( $\chi^2$ ) test to evaluate the relationship between hamburger type and *Salmonella* spp. prevalence, 0.251 (df=1;  $p=0.6165$ ), was lower than values considering significance levels  $\alpha=0.01$  (6.64) and  $\alpha=0.05$  (3.84), showing that there is no significant statistical difference between frequencies of the pathogens observed and expected.

Considering the methods used, in the analysis of 80 hamburger samples by the standard method, 17 (21.25%) were positive for *Salmonella* spp., 9 (22.5%) of which were beef hamburgers and 8 (20.0%) were beef and chicken hamburgers. Considering the Salmosyst method, 11 (13.75%) were shown to be contaminated with the bacteria, 3 (7.5%) beef and 8 (20.0%) beef and chicken hamburgers (Tab. 2).

**Table 2.** Number of hamburger samples positive for *Salmonella* spp. in each microbiological method used.

Type of hamburger	Method	
	Standard	Salmosyst
Beef	9 (52.94%)*	3 (27.27%)
Chicken and beef	8 (47.06%)	8 (72.73%)
<b>TOTAL</b>	<b>17 (100%)</b>	<b>11 (100%)</b>

\* Percentages calculated based on total numbers of samples used in each method.

The value of the chi-square ( $\chi^2$ ) test carried out to evaluate the association between method and *Salmonella* spp. prevalence was 1.558 (df=1;  $p=0.2119$ ), lower than the values considering significance levels  $\alpha = 0.01$  (6.64) and  $\alpha=0.05$  (3.84), showing the absence of statistical significance in the differences between frequencies of the pathogen measured and expected.

It is important to observe that, of the 22 hamburger samples positive for *Salmonella* spp., 11 (50.0%) were detected only using the standard methods, 5 (22.73%) were

detected using the Salmosyst method, and 6 (27.27%) were detected using both methods (**Tab. 3**).

**Table 3.** Number of hamburger samples positive for *Salmonella* spp. in each microbiological method used, and number of samples positive for the pathogen in both methods.

Type of hamburger	Method			TOTAL
	Standard	Salmosyst	Both	
Beef	7	1	2	<b>10</b> (45.45%)
Chicken and beef	4	4	4	<b>12</b> (54.55%)
<b>TOTAL</b>	<b>11</b> (50.0%)	<b>5</b> (22.73%)	<b>6</b> (27.27%)	<b>22</b> (100%)

The values calculated in the McNemar test was 1.5625 (for the two kinds of hamburgers together), 3.125 (for beef hamburgers), and 0.125 (for chicken and beef). All values were below the values considering significance levels  $\alpha=0.01$  (6.64) and  $\alpha=0.05$  (3.84), indicating that there is no statistically significant difference between *Salmonella* spp. prevalences using standard methodology and the Salmosyst method.

In the diagnostic tests, the results obtained show that the standard method to detect *Salmonella* spp. in hamburgers had intermediate sensitivity (54.55%) and high specificity (84.06%) and accuracy (80.0%) values. In turn, the values observed using the Salmosyst method were low for sensitivity (35.29%), indicating the likelihood of false negative results, and high for specificity (92.06%), pointing to a considerable reliability to detect false negative results. As in the standard method, accuracy was 80.0%.

In this sense, the conventional method was the most effective to identify hamburger samples that were really positive for *Salmonella* spp., while the Salmosyst method afforded to detect false negative results more successfully. As regard accuracy, both methods led to acceptable results for the detection of *Salmonella* spp. in hamburgers.

## Discussion

In a similar study carried out to detect *Salmonella* spp. in turkey hamburgers sold in the city of Niterói, Brazil, Almeida Filho et al. (2006) analyzed 30 samples, of which 15 (30%) were contaminated. Similarly, Parra et al. (2002) observed that, among 27 hamburger samples collected in the city of Maracaibo, Venezuela, of which 18 were beef hamburgers and 9 were chicken burgers, 9 (33.33%) beef hamburgers were contaminated with the pathogen.

In turn, in a study by Leal et al. (2008) that analyzed 60 hamburger samples, of which 30 were home-made and 30 were industrialized products, *Salmonella* spp. was isolated in one (1.66%) home-made hamburger.

In a study that analyzed 81 hamburger samples stored at different temperatures (-15°C, 5°C and 15°C) and for distinct periods of time (0 h, 48 h and 96 h), only one sample (1.23%) stored at 15°C for 96 h presented contamination by *Salmonella* spp., showing that the result may be ascribed to a combined effect of storage temperature and time that allowed the microorganism to thrive, if present in a sample, concomitantly with a decrease in initial microbiota, since *Salmonella* spp. is a weak competitor.

Other studies conducted to analyze *Salmonella* spp. in hamburgers did not reveal the presence of the pathogen in this food. Tavares and Serafini (2003) carried out a microbiological investigation on the quality of 100 hamburgers sold in fast food trailers in the city of Goiânia, Brazil, detecting no *Salmonella* spp. The same result was reported by Bezerra et al. (2010) in a study that analyzed 105 hamburger samples sold in the streets of Cuiabá, Brazil, using the standard microbiological method.

Narváez et al. (2005) reported no *Salmonella* spp. in 56 packaged hamburgers ready to be sold sampled in a small-scale hamburger processing plant in the city of Maracaibo, Venezuela. However, the microorganism was observed in samples collected during the molding stage (66.0%), followed by the mincing and mixing stage (22.0%) and the stage when the meat is diced (11.0%).

Disagreeing with these results, Pignato et al. (1995) used the standard and the Salmosyst methods to analyze 519 food samples, of which 85 were poultry, 246 were red meat (beef, pork and horse) as well as 188 eggs. *Salmonella* spp. was detected in 39 (7.5%) and 47 (9.0%) samples using the standard and the Salmosyst methods, respectively. The sensitivity for the Salmosyst method was (97.9%), while for the standard method sensitivity was 81.2%. The authors believe that the Salmosyst method, in the analysis of foods, presents several advantages. First, only two media are required, one liquid medium (used in pre-enrichment as well as in selective enrichment), and a solid medium (used in selective isolation), compared to the five media required in the standard method. Apart from this, the total time for analysis is shortened, from four to six days, down to 48 h. In actual fact, the pre-enrichment in Salmosyst broth and selective enrichment take only 6 and 18 h, respectively, while an additional period of 24 h is needed to perform incubation of dishes in solid medium, for selective isolation.

Corroborating the results observed herein, Fierens and Huyghebaert (1996) reported 27 *Salmonella* spp. positive samples in 217 foods of animal and plant origin. The standard method detected the pathogen in 17 (81.0%) and the Salmosyst indicated the presence of *Salmonella* spp. in only 8 (38.1%) of the samples analyzed. The authors also state that, in the Salmosyst method, in which enrichment in a liquid medium is shortened, analysis times were reduced by 24 h, compared to the standard method. However, the low recovery of *Salmonella* spp. may be due to several factors, like a short pre-enrichment stage (of 6 to 8 h),

enrichment in a low selectivity medium, or incubation at 37°C.

For Balckburn (1993), shortening incubation times in pre-enrichment and enrichment to 6 to 8 h has led to results considered reasonably reliable, compared to the standard methods in which times are more conservatively observed. However, in some cases higher numbers of false negative results may be observed.

### Conclusion

Of the hamburger samples analyzed, 22 (27.5%) were contaminated with *Salmonella* spp., and were thus considered inappropriate for human consumption and under inadequate sanitation conditions, as defined in Resolution N° 12, issued by the Board of the National Sanitation Authority (ANVISA), Ministry of Health (Brasil, 2001). Of the 22 positive samples, the pathogen was detected in 11 (50.0%) using the standard method, in 5 (22.73%) using the Salmosyst method, and in 5 (27.27%) in both methods concomitantly.

The standard method was the most effective to identify real positive results, while Salmosyst method afforded to characterize real negative results. As for accuracy, both methods were acceptable to analyze *Salmonella* spp. in hamburgers. However, no statistically significant differences were observed between results obtained using these methods.

DSA played an important role in the selective plating, due to the ease of identification of typical *Salmonella* spp. colonies that would then be streaked on TSI and LIA tubes (initial screening).

The importance of streaking *Salmonella* spp. colonies obtained using the TSI and LIA agars, with atypical characteristics 1 and 2 was also revealed, since these two sets of characteristics may be used to isolate atypical *Salmonella* spp. serotypes, which ferments lactose and *Salmonella* Paratyphi, which does not decarboxylate lysine, respectively.

Secondary screening was efficient as regards the differentiation between *Proteus* spp. and *Salmonella* spp. colonies, since it indicates the characteristic *Salmonella* spp. colonies that should undergo the seroagglutination test, that is, colonies negative for the urease test and the phenylalanine deamination test.

### References

Almeida Filho ES, Sigarini CO, Valente AM, Andrade PF, Oliveira LAT, Carvalho JCAP. 2006. Ocorrência de *Salmonella* spp. em hambúrguer de carne de peru (*Meleagris gallopavo*), comercializado no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. Hig. Aliment. 20(142), 132-136.

Bascombs S. 1987. Enzyme tests in bacterial identification. Method. Microbiol. 19, 105-160.

Beckers HJ, Heide JVD, Fenigsen-Narucka U, Peters R. 1987. Fate of salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Muller-Kauffmann's tetrathionate medium. J. Appl. Bacteriol. 62, 97-104.

Beckers HJ, Van Leusden FM, Meijssen MJM. 1985. Reference material for the evaluation of a standard method for the detection of salmonellas in foods and feeding stuffs. J. Appl. Bacteriol. 59, 507-512.

Bezerra ACD, Reis RB, Bastos DHM. 2010. Microbiological quality of hamburgers sold in the streets of Cuiabá-MT, Brasil and vendor hygiene-awareness. Ciênc. Tecnol. Aliment. 30(2), 520-524.

Blackburn CW. 1993. Rapid and alternative methods for the detection of salmonellas in foods. J. Appl. Bacteriol. 75, 199-214.

Brasil. 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa n° 20, de 31 de julho de 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndegas, de Apresentado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto.

Brasil. 2001. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 12, de 02 de janeiro de 2001. Estabelece os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos e Determina os Critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano.

Brasil. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e À gua.

Busse M. 1995. Media for *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol. 26, 117-131.

D'Aoust JY. 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol. 12, 17-40.

D'Aoust JY, Sewell AM, Warburton DW. 1992. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol. 16, 41-50.

Ferretti R, Mannazzu I, Cocolin L, Comi G, Clementi F. 2001. Twelve-hour PCR-based method for detection

- of *Salmonella* spp. in food. Appl. Environ. Microbiol. 67(2), 977-978.
- Fierens H, Huyghebaert A. 1996. Screening of *Salmonella* in naturally contaminated feeds with rapid methods. Int. J. Food Microbiol. 31, 301-309.
- Fricker CR. 1987. The isolation of salmonellas and campylobacters. J. Appl. Bacteriol. 63, 99-116.
- Garrick RC, Smith AD. 1994. Evaluation of Rambach agar for the differentiation of *Salmonella* species from other Enterobacteriaceae. Lett. Appl. Microbiol. 18, 187-189.
- Giombelli A, Silva NL. 2002. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carnes *in natura*. Hig. Aliment. 16(95), 88-91.
- Gooding CM, Choudary PV. 1999. Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. 13, 341-347.
- Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Publica Mexico. 42(6), 490-495.
- Kwang J, Littlelike ET, Keen JE. 1996. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. Lett. Appl. Microbiol. 22, 46-51.
- Leal KV, Chaar SAS, Ayala AB, Roo YA, Toledo LS, Urdaneta AG. 2008. Comparación de la calidad microbiológica de hamburguesa de pollo elaborada en forma artesanal e industrial. Rev. Cient. FCV-LUZ. XVIII(5), 624-630.
- Manafi M. 1996. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. Int. J. Food Microbiol. 31, 45-58.
- Manafi M. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. Int. J. Food Microbiol. 60, 205-218.
- Manafi M, Kreifel W, Bascombs S. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostic. Microbiol. Rev. 55(3), 335-348.
- Narváez CA, Parra KC, Huerta-Leidenz N, Rodas-González A, Moreno LA. 2005. Aislamiento de *Salmonella* y *Escherichia coli* patógenas durante el procesamiento de hamburguesas en una pequeña planta de Maracaibo, Venezuela. Rev. Cient. FCV-LUZ. XV(6), 551-559.
- Oliveira SD, Rodenbush CR, Cé MC, Rocha SLS, Canal CW. 2003. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. Lett. Appl. Microbiol. 36, 217-221.
- Parra KC, Piñero MPC, Narváez CA, Uzcátegui SB, Moreno LA, Huerta-Leidenz N. 2002. Evaluation of microbiological and physical-chemistry of frozen hamburger patties expended in Maracaibo, Zulia state, Venezuela. Rev. Cient. FCV-LUZ. XII(6), 715-720.
- Patil MD, Parhad NM. 1986. Growth of salmonellas in different enrichment media. J. Appl. Bacteriol. 61, 19-24.
- Pignato S, Marino AM, Emanuelle MC, Iannotta V, Caracappa S, Giammanco G. 1995. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonellae* in foods. Appl. Environ. Microbiol. 61(5), 1996-1999.
- Rambach A. 1990. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56(1), 301-303.
- Reis AO, Camargo CV. 2008. *Salmonella* spp. LEMC (Laboratório Especial de Microbiologia Clínica). UNIFESP. <<http://www.unifesp.br/dmed/dipa/lemc/bristolTeste14.htm>> Accessed on 14 October 2008.
- Riyaz-Ul-Hassan S, Verma V, Qazi GN. 2004. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. 18, 333-339.
- Siqueira RS. 1995. Manual de Microbiologia de Alimentos, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Rio de Janeiro.
- Siqueira RS, Dodd CER, Rees CED. 2003. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. Braz. J. Microbiol. 34(suppl. 1), 118-120.
- Tavares TM, Serafini AB. 2003. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo *trailers* em Goiânia (GO). Rev. Patol. Trop. 32(1), 45-52.
- Tsoraeva A, Marques PF. 2005. Meios cromogênicos e fluorogênicos: uma nova realidade. Rev. Ind. Latic. Nov/Dez, 12-15.
- Van Poucke LSG. 1990. *Salmonella*-TEK, a rapid screening method for *Salmonella* species in food. Appl. Environ. Microbiol. 56(4), 924-927.
- Van Schothorsdt M, Renau AM. 1985. Malachite green pre-enrichment medium for improved salmonella isolation from heavily contaminated samples. J. Appl. Bacteriol. 59, 223-230.

1 **PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM HAMBÚRGUERES CRUS ATRAVÉS DA**  
2 **REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE A PARTIR DE CALDO DE PRÉ-**  
3 **ENRIQUECIMENTO**

4  
5 Jorge Luiz Fortuna<sup>1</sup>; Virginia Léo de Almeida Pereira<sup>2</sup>; Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>2</sup>;  
6 Robson Maia Franco<sup>2</sup>

7  
8 <sup>1</sup> Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Laboratório de Microbiologia. *Campus X*. Curso  
9 de Ciências Biológicas. Av. Kaikan, s/n – Universitário. Teixeira de Freitas-BA. CEP:  
10 45.995-300. Brasil. Tel: 55(73)32638071. Fax: 55(73)32638054. Programa de Pós-  
11 Graduação (Doutorado) de Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene  
12 Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal – Universidade  
13 Federal Fluminense (UFF). E-mail: [jfortuna@uneb.br](mailto:jfortuna@uneb.br).

14  
15 **RESUMO**

16 A *Salmonella* spp. é uma bactéria patogênica que pode contaminar o hambúrguer, alimento  
17 muito consumido devido ao seu saboroma e praticidade no preparo. Pesquisas de *Salmonella*  
18 spp. em menor espaço de tempo e maior confiabilidade em amostras de alimentos são  
19 desenvolvidas na tentativa de facilitar e agilizar diagnósticos microbiológicos, tais como os  
20 testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR). Objetivou-se neste trabalho  
21 pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus de carne bovina e  
22 hambúrgueres mistos (carne bovina e carne de frango), através da PCR, utilizando diferentes

---

<sup>2</sup> Universidade Federal Fluminense (UFF). Faculdade de Veterinária. Niterói-RJ. Brasil.  
Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene  
Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. E-mail:  
[virginialeo@vm.uff.br](mailto:virginialeo@vm.uff.br); [elmiro@vm.uff.br](mailto:elmiro@vm.uff.br); [robsonmf@vm.uff.br](mailto:robsonmf@vm.uff.br)

23 tempos de incubação dos caldos de pré-enriquecimento. Foram analisados 80 hambúrgueres,  
24 sendo 40 de carne bovina e 40 mistos (carne bovina e carne de frango). Das 80 amostras  
25 analisadas de hambúrgueres crus pelo método da PCR, 18 (22,5%) apresentaram  
26 contaminação por *Salmonella* spp. A pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus pela  
27 PCR foi mais efetiva quando as amostras passaram pela etapa de pré-enriquecimento com  
28 incubação de 24 horas a 36°C.

29 **PALAVRAS-CHAVE:** Hambúrguer, PCR, *Salmonella*, Pré-enriquecimento.

30

31 *SEARCH OF Salmonella spp. IN RAW HAMBURGERS BY POLYMERASE CHAIN*

32 *REACTION USING PRE-ENRICHMENT BROTH*

33

34 **ABSTRACT**

35 *Salmonella* spp. is a pathogenic bacterium that contaminates hamburgers, a widely  
36 consumed food item that is easy to prepare and whose flavor is well-liked. Methods to detect  
37 *Salmonella* spp. within short time intervals and that yield reliable results in food samples are  
38 developed to facilitate and speed up microbiological diagnosis, such as the polymerase chain  
39 reaction (PCR). The aim of the present study was to evaluate the presence of *Salmonella* spp.  
40 in raw beef and beef and chicken hamburgers by PCR under different incubation times of pre-  
41 enrichment broths. In total, 80 hamburgers were analyzed, 40 of which were beef hamburgers  
42 and 40 were beef and chicken hamburgers. Eighteen samples (22.5%) were contaminated with  
43 *Salmonella* spp. The PCR protocol afforded to effectively detect the bacterium in raw  
44 hamburgers using pre-enrichment broth incubated for 24 h at 36°C.

45 **KEY WORDS:** Hamburger, PCR, *Salmonella*, Pre-enrichment.

46

47

## INTRODUÇÃO

48  
49 O hambúrguer é um alimento muito consumido devido sua praticidade no preparo e por  
50 suas características sensoriais, entretanto, há uma alta probabilidade de ocorrer contaminação  
51 por microrganismos patogênicos na matéria prima, como também nos ingredientes e/ou  
52 condimentos utilizados no seu processamento. Além disso, conforme afirmaram RIVAS et al.  
53 (2003) e TAVARES; SERAFINI (2006), durante a produção do hambúrguer pode ocorrer  
54 contaminação resultante da adoção de práticas inadequadas de higiene ou após adição de  
55 condimentos ou outros ingredientes contaminados.

56 A *Salmonella* spp. é uma bactéria patogênica que pode contaminar os alimentos,  
57 principalmente os de origem animal, sendo uma das principais responsáveis por causar  
58 infecções alimentares, denominadas salmoneloses.

59 A detecção e identificação de bactérias do gênero *Salmonella* em alimentos é muito  
60 importante para o controle e a prevenção de surtos de infecção alimentar causados por estes  
61 microrganismos. Porém, a pesquisa para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos através de  
62 métodos tradicionais utilizando meios de cultura clássicos, requer cerca de cinco a sete dias.  
63 Além disso, tem-se a possibilidade de serem obtidos resultados falso-positivos, devido  
64 principalmente a presença de outros microrganismos no alimento que competem diretamente  
65 com as células bacterianas de *Salmonella* spp.

66 O isolamento de *Salmonella* spp. é influenciado particularmente pela presença de  
67 microrganismos competidores. Entretanto a microbiota competidora não é representativa da  
68 microbiota que ocorre naturalmente no alimento. Adicionando o material de referência a uma  
69 mistura da Água Peptonada Tamponada e do alimento a ser examinado, antes da incubação,  
70 os microrganismos competidores que ocorrem naturalmente no alimento podem ser utilizados  
71 (BECKERS et al., 1985). Estes procedimentos diagnósticos incluem geralmente o pré-  
72 enriquecimento de uma amostra de alimento em um meio não-seletivo para facilitar e/ou

73 permitir o reparo das células de *Salmonella* spp. estressadas ou injuriadas, encontradas  
74 frequentemente em alimentos crus e processados, e subsequente multiplicação. O crescimento  
75 deve conduzir a um número suficientemente elevado destes organismos para assegurar a  
76 sobrevivência à exposição a um meio altamente seletivo de enriquecimento na próxima etapa  
77 (D'AOUST et al., 1992, VAN SCHOTHORST; REBAUD, 1985).

78 FRICKER (1987) considerou que os termos regeneração ou pré-enriquecimento são  
79 usados frequentemente sem a consideração devida do seu real significado e o termo cultura do  
80 pré-enriquecimento denota geralmente uma cultura que seja feita por duas razões. A  
81 inoculação direta de uma amostra naturalmente contaminada em meios de enriquecimento  
82 seletivos conduz frequentemente a uma falha ao recuperar os organismos de interesse. Isto  
83 pode ocorrer por duas razões. Algumas células bacterianas saudáveis são mortas  
84 frequentemente quando adicionadas aos meios de enriquecimento seletivos e assim caso  
85 estejam em baixos números estes meios podem conduzir à morte de toda a população do  
86 microrganismo de interesse. A cultura do pré-enriquecimento permite que o número de  
87 microrganismos aumente, reduzindo assim os efeitos prejudiciais das mortes iniciais. Além  
88 disso, células injuriadas são mais sensíveis aos agentes seletivos do que as células não  
89 injuriadas e, desde que a maioria de técnicas do enriquecimento foi projetada usando células  
90 saudáveis, a concentração de agentes seletivos atuais em meios de enriquecimento não podem  
91 facilitar a recuperação de organismos injuriados. Neste caso o pré-enriquecimento permite as  
92 células de interesse reparar todas as lesões e iniciarem assim sua resistência aos agentes  
93 seletivos, antes do enriquecimento. Em muitos casos pode-se tentar recuperar um pequeno  
94 número de células injuriadas e assim ambos os eventos ocorrem durante o pré-  
95 enriquecimento, logo, as células injuriadas podem se reparar e se multiplicarem  
96 demasiadamente antes que sejam expostas aos agentes seletivos.



97 O isolamento e identificação de *Salmonella* spp., em menor espaço de tempo e maior  
98 confiabilidade em amostras de alimentos, tem se tornado cada vez mais importante, tanto que  
99 novas técnicas estão sempre sendo testadas e desenvolvidas na tentativa de facilitar e agilizar  
100 estes diagnósticos microbiológicos. Tais como os testes baseados na reação em cadeia da  
101 polimerase (PCR).

102 A reação em cadeia do polimerase é um método que produz cópias de um DNA alvo. A  
103 detecção do DNA alvo no genoma de um microrganismo patogênico viral ou bacteriano é  
104 conseguida com o uso de curtos fragmentos sintéticos, isolados do DNA, sendo conhecidos  
105 como “primers” de oligonucleotídeos. Estes “primers” podem ser projetados para serem  
106 específicos para um microrganismo individual, ou para um grupo de microrganismos. Na  
107 PCR trabalha-se usando uma ciclagem de temperaturas diferentes. No método mais comum  
108 são empregadas três temperaturas distintas. A dupla fita do DNA é separada em fitas  
109 individuais usando uma alta temperatura, geralmente 90°C. Uma temperatura mais baixa é  
110 usada então para o anelamento dos “primers” à seção alvo do DNA. Em uma temperatura  
111 intermediária entre as duas temperaturas precedentes, a enzima polimerase produz uma cópia  
112 espelho do DNA alvo. Este ciclo das temperaturas é repetido diversas vezes. A partir de 25-30  
113 ciclos, devido à natureza exponencial do método da PCR, mais de  $10^9$  cópias do DNA alvo  
114 pode teoricamente ser produzida. Estas cópias do DNA alvo pode então ser detectadas usando  
115 métodos padrões tais como a eletroforese do gel de agarose ou a hibridação da membrana  
116 (ALBERTS et al., 2004, TOZE, 1999).

117 As técnicas utilizadas, para a pesquisa de microrganismos, aplicadas na cadeia produtiva  
118 dos alimentos de origem animal, têm como objetivo principal diminuir os riscos de causar  
119 doenças alimentares aos consumidores destes alimentos, além de testar a qualidade destes  
120 produtos comercializados.

121           Objetivou-se neste trabalho pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em hambúrgueres  
122 crus de carne bovina e hambúrgueres mistos (carne bovina e carne de frango), através do  
123 método de reação em cadeia da polimerase, utilizando diferentes tempos de incubação em  
124 dois diferentes caldos de pré-enriquecimento.

125

126

## MATERIAL E MÉTODOS

### 127 **Local e Área do Estudo**

128           A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de  
129 Origem Animal e no Laboratório de Epidemiologia Molecular, ambos da Faculdade de  
130 Veterinária da Universidade Federal Fluminense, onde foram analisadas as amostras de  
131 hambúrgueres de carne bovina e de hambúrgueres misto (carne bovina e carne de frango),  
132 adquiridas no comércio formal (supermercados e/ou açougues) do município de Niterói-RJ.

133

### 134 **Coletas de Amostras**

135           Foram adquiridos 80 hambúrgueres no comércio formal (supermercados e/ou açougues)  
136 do município de Niterói-RJ, sendo 40 de carne bovina e 40 mistos (carne bovina e carne de  
137 frango), que eram comercializados embalados individualmente em cartuchos de polipropileno  
138 duplos ou simples, com peso individual variando de 56 g a 120 g. Sendo assim, um conjunto  
139 de quatro hambúrgueres foi considerado uma unidade amostral. Estes eram armazenados em  
140 sacos de polietileno de baixa densidade com fecho hermético, mantidas em recipiente  
141 isotérmico portátil, com gelo, até a chegada ao Laboratório de Controle Microbiológico de  
142 Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal  
143 Fluminense, onde foi realizada a etapa do pré-enriquecimento.

144

145

## 146 **Microbiologia Convencional**

147 Foram pesadas, em balança digital de precisão, e em saco para homogeneização, 25 g da  
148 amostra e adicionados 225 mL de Solução Salina Peptonada Tamponada 1% (SSPT). Em  
149 seguida, foram homogeneizados por 60 segundos no “Stomacher” em velocidade normal.  
150 Fechou-se hermeticamente o saco contendo a amostra e a SSPT e deixou-se em repouso por  
151 uma hora em temperatura ambiente antes de ser colocado em estufa a temperatura de 36°C/24  
152 horas (BRASIL, 2003).

153

## 154 **Método Salmosyst**

155 Foram pesadas, em balança digital de precisão, e em saco para homogeneização, 25 g da  
156 amostra e adicionados 225 mL de Caldo Base Salmosyst para Pré-enriquecimento (CBSY).  
157 Em seguida, foram homogeneizados por 60 segundos no “Stomacher” em velocidade normal.  
158 Fechou-se hermeticamente o saco contendo a amostra e a CBSY e deixou-se em repouso por  
159 uma hora em temperatura ambiente antes de ser colocado em estufa a temperatura de 36°C  
160 por seis horas. Para o enriquecimento seletivo Salmosyst, transferiu-se 10,0 mL do CBSY  
161 para tubos de ensaio contendo 1,0 mL do Suplemento, tornando-se um Caldo Seletivo, e  
162 incubou-se a 36°C por 18 horas (PIGNATO et al., 1995).

163

## 164 **Reação em Cadeia da Polimerase**

165 As análises da PCR nas amostras para detecção de *Salmonella* spp., foram realizadas no  
166 Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da Universidade  
167 Federal Fluminense.

168 A partir do Caldo de pré-enriquecimento (SSPT), utilizado na microbiologia  
169 convencional, foi transferida uma alíquota de 0,7 mL nos tempos seis horas e 24 horas de  
170 incubação, para diferentes microtubos de polipropileno (tipo “Eppendorf”) esterilizados, para

171 a realização da extração do DNA e em seguida a amplificação deste DNA, utilizando a  
172 técnica da reação em cadeia da polimerase.

173 Para o método Salmosyst as alíquotas de 0,7 mL foram transferidas para diferentes  
174 microtubos de polipropileno (tipo “Eppendorf”) esterilizados, a partir do Caldo Base  
175 Salmosyst para Pré-enriquecimento (CBSY) no tempo seis horas e do Caldo Seletivo com  
176 Suplemento no tempo 24 horas.

177 Adicionou-se 0,7 mL de glicerol aos respectivos microtubos de polipropileno para que  
178 estes fossem estocados a -20°C até o momento da extração e amplificação do DNA.

179

### 180 **Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase**

181 O protocolo utilizado foi baseado em FLÔRES et al. (2001), SANTOS et al. (2001a) e  
182 SANTOS et al. (2001b), onde a extração de DNA foi realizada por tratamento térmico.

183 Utilizou-se um par de “primer” que amplifica 284 pares de base (pb), com a sequência  
184 de oligonucleotídeos derivada do gen *invA*: Primer 1 (*invA* 159: 5’ GTG AAA TTA TCG  
185 CCA CGT TCG GGC AA 3’); Primer 2 (*invA* 141: 5’ TCA TCG CAC ACG TCA AAG GAC  
186 C 3’).

187

### 188 **Extração do DNA pelo método térmico**

189 De cada uma das amostras provenientes dos respectivos caldos de pré-enriquecimento  
190 da microbiologia convencional e do método Salmosyst, acondicionadas anteriormente em  
191 microtubos de polipropileno (tipo “Eppendorf”), foram retiradas alíquotas de 300 µL (com o  
192 auxílio de micropipetas com ponteiras) e transferidas para novos microtubos onde foram  
193 acrescentados igual volume (300 µL) de solução Tampão TE (Tris-EDTA). Homogeneizou-se  
194 por 30 segundos em agitador automático de tubos e logo em seguida os microtubos foram  
195 centrifugados durante 30 minutos a 13.500 rpm a 10°C. Descartou-se o sobrenadante (com o

196 auxílio de micropipeta e ponteiros) e utilizou-se aproximadamente 50 µL do sedimento.  
197 Adicionou-se mais 100 µL de solução Tampão TE e homogeneizou-se por dez segundos em  
198 agitador automático de tubos. Após a homogeneização os microtubos foram mantidos por dez  
199 minutos em bloco térmico a 94°C e imediatamente foram transferidos para a centrifugação  
200 durante um minuto a 13.500 rpm a 10°C. Com o auxílio de micropipeta e ponteiros,  
201 transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos onde logo depois estes foram levados ao  
202 congelador a uma temperatura de -20°C por 10 minutos antes da fase de amplificação.

203

#### 204 **Amplificação do DNA**

205 As reações de PCR foram realizadas em microtubo cônico de polipropileno de 200 µL,  
206 onde foram adicionados (com o auxílio de micropipeta e ponteiros) 4,4 µL água ultra pura; 5,0  
207 µL de Tampão 10X; 5,0 µL (50 mM) de MgCl<sub>2</sub> (cloreto de magnésio); 5,0 µL de dNTP mix  
208 (25 µM de cada nucleotídeo); 1,0 µL (100 µmol) do Primer 1 (*invA* 159: 5' GTG AAA TTA  
209 TCG CCA CGT TCG GGC AA 3'); 1,0 µL (100 µmol) do Primer 2 (*invA* 141: 5' TCA TCG  
210 CAC ACG TCA AAG GAC C 3'); 1,2 µL de BSA (Albumina de Soro Bovino) (400µg/mL);  
211 0,4 µL da *Taq* DNA polimerase (2,0 U) e 2,0 µL da amostra (DNA purificado) gerando um  
212 volume final de 25,0 µL. Como controle positivo foi utilizado 2,0 µL de amostra DNA de  
213 *Salmonella* Enteritidis e como controle negativo 2,0 µL de água ultra pura. As condições de  
214 amplificação foram: um ciclo de cinco minutos a 94°C (desnaturação); 35 ciclos de 94°C por  
215 30 segundos (desnaturação), 54°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos  
216 (extensão); e um ciclo de extensão final de sete minutos a 72°C. Após a amplificação por  
217 PCR, o volume total de reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE  
218 (Tris Borato EDTA) 0,5X corado com 5,5 mg/mL de brometo de etídio. Os fragmentos  
219 amplificados foram visualizados em transluminador ultravioleta e fotodocumentados.

220

## 221 **Análise Estatística**

222 O tratamento estatístico para as análises de significância das diferenças encontradas nos  
223 métodos comparados realizado pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com um nível de significância  
224 de 95% ( $\alpha=0,05$ ) e 99% ( $\alpha=0,01$ ). A fim de se comprovar a existência da concordância dos  
225 resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. através dos métodos utilizados, realizou-se o teste  
226 de McNemar. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico  
227 *BioEstat*® 3.0 versão 2003 (AYRES et al., 2003)

228

229

## **RESULTADOS**

230 Das 80 amostras analisadas de hambúrgueres crus pelo método da PCR, 18 (22,5%)  
231 apresentaram contaminação por *Salmonella* spp., sendo que oito (10,0%) foram detectadas  
232 somente pela PCR a partir do Caldo de Pré-enriquecimento da microbiologia convencional  
233 (Solução Salina Peptonada Tamponada – SSPT), após 24 horas de incubação; oito (10,0%) a  
234 partir do Caldo Seletivo com Suplemento do método Salmosyst, também após 24 horas de  
235 incubação e duas (2,5%) por ambos os métodos. Sendo assim, cada um dos métodos, tanto a  
236 PCR a partir do Caldo de Pré-enriquecimento da microbiologia convencional, quanto a PCR a  
237 partir do Caldo Seletivo com Suplemento Salmosyst, identificaram cada um deles, dez  
238 (12,5%) amostras positivas para *Salmonella* spp., respectivamente (Tabela 1).

239 Importante destacar que do total das 18 amostras de hambúrgueres positivas para  
240 *Salmonella* spp., oito (44,44%) foram detectadas somente pela PCR a partir do Caldo de Pré-  
241 enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional, oito (44,44%) somente pela PCR a  
242 partir do Caldo com Suplemento do método Salmosyst e apenas duas (11,11%) por ambos os  
243 Caldos (Tabela 2).

244 A partir da SSPT da microbiologia convencional, após seis horas de incubação, apenas  
245 uma (1,25%) amostra apresentou contaminação por *Salmonella* spp., sendo que esta amostra

246 também foi positiva após 24 horas de incubação. Obteve-se o mesmo resultado a partir do  
247 Caldo Base Salmosyst para Pré-enriquecimento (CBSY), que foi incubado até seis horas,  
248 onde apenas uma (1,25%) amostra foi positiva para *Salmonella* spp., que também apresentou  
249 resultado positivo após 24 horas de incubação. Um exemplo de gel de agarose de eletroforese  
250 do produto de PCR a partir do gene *invA* pode ser observado na Figura 1.

251 O valor do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) calculado para se observar se houve associação  
252 entre os diferentes resultados de detecção de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus de  
253 acordo com o tempo de incubação dos Caldos utilizados para a PCR (GL=3) foi de 15,8145,  
254 para  $p=0,012$ . Sendo maior que os valores tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$   
255 (11,34) e  $\alpha=0,05$  (7,81), concluindo-se serem significativos os desvios observados, isto é, a  
256 frequência de amostras de hambúrgueres crus contaminados por *Salmonella* spp., dependeram  
257 do método utilizado.

258 O valor calculado pelo teste de McNemar para avaliar o grau de discordância dos dois  
259 tratamentos (PCR a partir do Caldo de Pré-enriquecimento da microbiologia convencional e  
260 PCR a partir do Caldo Seletivo com Suplemento Salmosyst) foi de 0,0625 ( $p=0,8026$ ), sendo  
261 menor que os tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (6,64) e  $\alpha=0,05$  (3,84), indicando  
262 que não há discordância nos resultados de pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus  
263 analisados pela PCR, a partir dos diferentes tipos de Caldos incubados por 24 horas, utilizados  
264 na investigação.

265 Das 18 (22,5%) amostras, positivas para *Salmonella* spp., oito (10,0%) eram de  
266 hambúrgueres de carne bovina e dez (12,5%) eram mistos (carne bovina e carne de frango)  
267 (Tabela 3).

268 O valor do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) calculado para se observar se houve associação  
269 entre tipo de hambúrguer e incidência de *Salmonella* spp. (GL=1) foi de 0,287, para  
270  $p=0,5923$ . Sendo menor que os valores tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (6,64) e

271  $\alpha=0,05$  (3,84), indicando que não há diferença significativa entre as frequências observadas e  
272 as frequências esperadas, podendo ser atribuídos ao acaso.

273 Das 80 amostras de hambúrgueres analisadas, através da PCR, a partir do Caldo de Pré-  
274 enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional, dez (12,5%) apresentaram-se  
275 contaminados pela *Salmonella* spp., sendo que das 40 amostras de hambúrgueres de carne  
276 bovina, quatro (10,0%) apresentaram positividade para *Salmonella* spp. e das 40 amostras de  
277 hambúrgueres mistos, seis (15,0%) estavam contaminados por *Salmonella* spp. Os mesmos  
278 valores também foram encontrados nas 80 amostras analisadas pela PCR a partir do Caldo  
279 Seletivo com Suplemento do método Salmosyst (Tabela 4). Sendo assim, não houve diferença  
280 entre os resultados encontrados em relação aos diferentes Caldos utilizados na PCR.

281

282

## DISCUSSÃO

283 Segundo STONE et al. (1995), para a detecção de *Salmonella* spp., a etapa de pré-  
284 enriquecimento é importante para a realização da PCR devido principalmente ao baixo valor,  
285 pois é barata se comparada com outros meios e/ou reagentes; não precisa de muita  
286 manipulação e/ou técnica; dilui as substâncias inibidoras da PCR; além de propiciar o  
287 aumento de células viáveis de *Salmonella* spp.

288 Corroborando os resultados encontrados neste trabalho, MYINT et al. (2006) observaram  
289 que quando a PCR foi realizada sem o pré-enriquecimento, em nenhuma amostra  
290 naturalmente contaminada detectou-se *Salmonella* spp., entretanto, quando utilizou-se a etapa  
291 de pré-enriquecimento a sensibilidade da PCR aumentou até 79%. Também CROCI et al.  
292 (2004) afirmaram que a melhor sensibilidade da PCR em amostras contaminadas  
293 artificialmente ocorre a partir do pré-enriquecimento de no mínimo cinco horas.

294 Tal como no presente trabalho, SANTOS et al. (2001b) observaram que, sobre os  
295 diferentes tempos de incubação, seus resultados negativos aconteceram quando as amostras de



296 carne foram incubadas em caldos de pré-enriquecimento somente até seis e oito horas. Sendo  
297 que os resultados positivos ocorreram após 24 horas de incubação, conforme resultados  
298 encontrados na presente pesquisa. Também em estudo realizado por RISSATO et al. (2011), em  
299 carcaças de frango resfriadas pela PCR, os resultados obtidos na pesquisa de *Salmonella* spp.  
300 de acordo com os diferentes tempos de incubação, observou-se que a sensibilidade da técnica  
301 da PCR utilizando a água de lavagem (água salina peptonada 1%) sem incubação foi de 0%.  
302 Após o pré-enriquecimento de 24 horas a sensibilidade foi de 3,3% (1/30) e depois de 48  
303 horas de incubação a sensibilidade aumentou para 16,7% (5/30).

304 Em contrapartida, os resultados obtidos por MARSIGLIA et al. (1997), através da  
305 realização da PCR diretamente do caldo de pré-enriquecimento de amostras de alimentos foi  
306 inferior ao esperado. Em seu estudo, a detecção pela PCR só foi possível em amostras de  
307 alimentos contaminados artificialmente com contagens altas de *Salmonella* spp. Resultado  
308 similar foi obtido por AABO et al. (1995), que detectaram apenas uma de 12 amostras naturais  
309 positivas de *Salmonella* spp. em PCR realizada diretamente do caldo de pré-enriquecimento.  
310 A presença de inibidores da *Taq* DNA polimerase, bem como de DNA de outros  
311 microrganismos podem ser responsáveis pela baixa eficiência destes ensaios.

312 Ao contrário dos resultados encontrados neste estudo, FERRETTI et al. (2001)  
313 pesquisaram a presença de *Salmonella* spp. inoculando-a artificialmente em alimentos e  
314 depois utilizando, para a PCR, diferentes tempos de incubação a 37°C/24 h do caldo de pré-  
315 enriquecimento não seletivo (duas, quatro, seis e oito horas). *Salmonella* spp. foram  
316 indetectáveis imediatamente após a inoculação e após duas horas de incubação em caldo de  
317 pré-enriquecimento, já os homogeneizados de 100 mL com inoculação de  $10^4$ ,  $10^3$ , e  $10^2$  de  
318 células de *Salmonella* spp. foi positivo após quatro horas de pré-enriquecimento. Após seis  
319 horas, a *Salmonella* spp. também foi detectável nas amostras inoculadas com dez células e  
320 uma célula por 100 mL de homogeneizado, respectivamente. A sensibilidade do método não

321 foi aumentada após oito horas de pré-enriquecimento, permitindo assim a definição do tempo  
322 de pré-enriquecimento ótimo como seis horas.

323

324

## CONCLUSÃO

325 Das amostras de hambúrgueres analisadas através da PCR, 18 (22,5%) apresentaram-se  
326 contaminadas pelo microrganismo *Salmonella* spp., sendo classificadas como em condições  
327 sanitárias microbiológicas insatisfatórias. O tipo de matéria prima do hambúrguer não  
328 interferiu na detecção de *Salmonella* spp. A pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres  
329 crus pela PCR foi mais efetiva quando a amostra passou pela etapa de pré-enriquecimento  
330 com incubação de 24 horas a 36°C do que a seis horas de incubação. Sendo assim, torna-se de  
331 suma importância a utilização deste período de incubação para detecção de *Salmonella* spp.  
332 em amostras de alimentos. Verificou-se que com a utilização de mais de um tipo de caldo de  
333 pré-enriquecimento, maior a chance de detecção de *Salmonella* spp.

334

335

## REFERÊNCIAS

- 336 AABO, S.; ANDERSEN, J.K.; OLSEN, J.E. Detection of *Salmonella* in minced meat by the  
337 polymerase chain reaction method. *Letters in Applied Microbiology*. v. 21, p. 180-182, 1995.
- 338 ALBERTS, B.; JOHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia*  
339 *Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2004, 1463 p.
- 340 AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. *BioEstat 3.0 – Aplicações*  
341 *Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá.  
342 Brasília: CNPq. 2003, 290 p.
- 343 BECKERS, H.J.; VAN LEUSDEN, F.M.; MEIJSEN, M.J.M. Reference material for the  
344 evaluation of a standard method for the detection of salmonellas in foods and feeding stuffs.  
345 *Journal of Applied Bacteriology*. v. 59, p. 507-512, 1985.
- 346 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa  
347 Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 62*, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os  
348 Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de  
349 Origem Animal e Água.
- 350 CROCI, L.; DELIBATO, E.; VOLPE, G.; DE MEDICI, D.; PALLESCHI, G. Comparison of  
351 PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standard culture method  
352 for detecting *Salmonella* in meat products. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 70, n.  
353 3, p. 1393-1396, 2004.

- 354 D'AOUST, J.Y.; SEWELL, A.M.; WARBURTON, D.W. A comparison of standard cultural  
355 methods for the detection of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food*  
356 *Microbiology*. v. 16, p. 41-50, 1992.
- 357 FERRETTI, R.; MANNAZZU, I.; COCOLIN, L.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour  
358 PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Applied and Environmental*  
359 *Microbiology*. v. 67, n. 2, p. 977-978, 2001.
- 360 FLÔRES, M.L.; NASCIMENTO, V.P.; KADER, I.I.T.A.; SANTOS, L.R.; PONTES, A.P.;  
361 SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Métodos de extração de DNA para a detecção de *Salmonella*  
362 em ovos de galinhas com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. *Ciência*  
363 *Rural*. v. 31, n. 2, p. 315-318, 2001.
- 364 FRICKER, C.R. The isolation of salmonellas and campylobacters. *Journal of Applied*  
365 *Bacteriology*. v. 63, p. 99-116, 1987.
- 366 MARSIGLIA, M.L.; IKUTA, N.; FONSECA, A.K.; SCHUCH, D.T.; HÖTZEL, I.; OZAKI,  
367 L.S.; MARQUES, E.K.; LUNGE, V.R. Development of a combined selective enrichment  
368 method and polymerase chain reaction (PCR) assay for sensitive detection of *Salmonella* in  
369 food samples. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 13, p. 649-654, 1997.
- 370 MYINT, M.S.; JOHNSON, Y.J.; TABLANTE, N.L.; HECKERT, R.A. The effect of pre-  
371 enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally  
372 contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food*  
373 *Microbiology*. v. 23, p. 599-604, 2006.
- 374 PIGNATO, S.; MARINO, A.M.; EMANUELLE, M.C.; IANNOTTA, V.; CARACAPPA, S.;  
375 GIAMMANCO, G. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of  
376 *Salmonellae* in foods. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 16, n. 5, p. 1996-1999,  
377 1995.
- 378 RISSATO, D.P.; BORGIO, A.P.; MOREIRA, J.P.; BAPTISTA, F.; CONTI, A.C.M.;  
379 RIBEIRO, A.B. Detecção de *Salmonella* spp. em água de lavagem de carcaças de frango  
380 utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR). *Revista Saúde e Pesquisa*. v.  
381 4, n. 1, p. 35-39, 2011.
- 382 RIVAS, M.; CALETTI, M.G.; CHINEN, I.; REFI, S.M.; ROLDÁN, C.D.; CHILLEMI, G.;  
383 FIORILLI, G.; BERTOLOTTI, A.; AGUERRE, L.; ESTANI, S.S. Home-prepared hamburger  
384 and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. v. 9, n. 9,  
385 p. 1184-1186, 2003.
- 386 SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; FLÔRES, M.L.; PONTES, A.P.;  
387 PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Identificação de *Salmonella*  
388 através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). *Arquivos da Faculdade de Veterinária*  
389 *UFRGS*. v. 29, n. 2, p. 87-92, 2001a.
- 390 SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; FLÔRES, M.L.; PONTES, A.P.;  
391 RIBEIRO, A.R.; SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Polymerase chain reaction (PCR) for the  
392 detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Revista do Instituto de*  
393 *Medicina Tropical de São Paulo*. v. 43, n. 5, p. 247-250, 2001b.
- 394 STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; MCVEY, S.; GALLAND, J.C.; CURTIS III,  
395 R.; KELLY, S.M.; CHENGAPPA, M.M. Detection of *Salmonella typhimurium* from rectal  
396 swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR-hybridization.  
397 *Journall of Clinical Microbiology*. v. 33, n. 5, p. 1292-1295, 1995.

- 398 TAVARES, T.M.; SERAFINI, A.B. Carnes de hambúrgueres prontas para consumo: aspectos  
399 legais e riscos bacterianos. *Revista de Patologia Tropical*. v. 35, n. 1, p. 1-21, 2006.
- 400 TOZE, S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water*  
401 *Research*. v. 33, n. 17, p. 3545-3556, 1999.
- 402 VAN SCHOTHORST, M.; RENAUD, A.M. Malachite green pre-enrichment medium for  
403 improved *Salmonella* isolation from heavily contaminated samples. *Journal of Applied*  
404 *Bacteriology*. v. 59, p. 223-230, 1985.
- 405
- 406

Tabela 1 – Resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus através da reação em cadeia da polimerase de acordo com os diferentes Caldos de pré-enriquecimento e tempos de incubação.

RESULTADOS	Caldo de Pré-enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional	Caldo Base Salmosyst para Pré-enriquecimento (CBSY)	Caldo de Pré-enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional	Caldo Seletivo com Suplemento do método Salmosyst
<b>Tempo de Incubação</b>	6 horas	6 horas	24 horas	24 horas
<b>Nº de amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp.</b>	1 (1,25%)	1 (1,25%)	10 (12,5%)	10 (12,5%)
<b>Nº de amostras negativas para <i>Salmonella</i> spp.</b>	79 (98,75%)	79 (98,75%)	70 (87,5%)	70 (87,5%)

407

408

Tabela 2 – Número de amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp. de acordo com o tipo de Caldo utilizado, evidenciando as amostras que foram positivas em ambos os Caldos.

Tipo de Hambúrguer	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE			TOTAL
	Caldo de Pré-enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional (24 horas)	Caldo Seletivo com Suplemento do método Salmosyst (24 horas)	Ambos	
Carne Bovina	4	4	---	<b>8 (44,44%)</b>
Carne Bovina+Carne de Frango	4	4	2	<b>10 (55,56%)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>8 (44,44%)</b>	<b>8 (44,44%)</b>	<b>2 (11,11%)</b>	<b>18 (100%)</b>

409

410

411

412

413

414

415

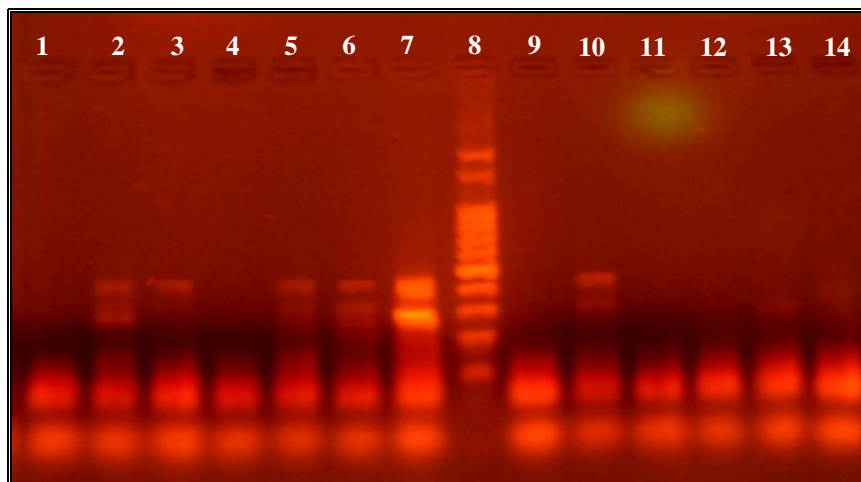


Fig. 1 – Gel de agarose de eletroforese do produto da PCR a partir do gene *invA*. 8: marcador de pares de base (100pb); 7: controle positivo (*Salmonella* Enteritidis); 9: controle negativo; 2, 3, 5, 6, 10: amostras positivas (284pb); 1, 4, 11, 12, 13, 14: amostras negativas.

416

417

418

419

420

421

Tabela 3 – Número de *Salmonella* spp. detectadas nas amostras de hambúrgueres de carne bovina e misto (carne bovina e carne de frango) analisadas pela PCR.

Tipo de Hambúrguer	<i>Salmonella</i> spp. (PCR)		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Carne Bovina	8	32	40
Carne Bovina+Carne de Frango	10	30	40
<b>TOTAL</b>	<b>18 (22,5%)</b>	<b>62 (77,5%)</b>	<b>80 (100%)</b>

422

Tabela 4 – Número de amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp. de acordo com o tipo de Caldo utilizado e o tipo de hambúrguer.

Tipo de Hambúrguer	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	
	Caldo de Pré-enriquecimento (SSPT) da microbiologia convencional (24 horas)	Caldo Seletivo com Suplemento do método Salmosyst (24 horas)
Carne Bovina	4 (40,0%)*	4 (40,0%)
Carne Bovina+Carne de Frango	6 (60,0%)	6 (60,0%)
<b>TOTAL</b>	<b>10 (100%)</b>	<b>10 (100%)</b>

\* Porcentagens calculadas de acordo com o total de cada Caldo utilizado.

423

**Conventional microbiology, Salmosyst method and polymerase chain reaction: a comparison in the detection of *Salmonella* spp. in raw hamburgers**

JORGE LUIZ FORTUNA<sup>1\*</sup>; VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA<sup>2</sup>; ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO<sup>2</sup>; ROBSON MAIA FRANCO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Laboratório de Microbiologia. *Campus X*. Curso de Ciências Biológicas. Av. Kaikan, s/n – Universitário. Teixeira de Freitas-BA. CEP: 45.995-300. Brasil. Tel: 55(73)32638071. Fax: 55(73)32638054. Programa de Pós-Graduação (Doutorado) de Medicina Veterinária. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal Fluminense (UFF).

<sup>2</sup> Universidade Federal Fluminense (UFF). Faculdade de Veterinária. Niterói-RJ. Brasil. Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Two TABLES and one FIGURE.

**Keywords:** Hamburger; Conventional Microbiology; Salmosyst; PCR; *Salmonella*.

**Palavras-chave:** Hambúrguer; Microbiologia Convencional; Salmosyst; PCR; *Salmonella*.

**Short Title:** Comparing methods for detection of *Salmonella*

---

\* Corresponding author: JORGE LUIZ FORTUNA. Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Laboratório de Microbiologia. *Campus X*. Curso de Ciências Biológicas. Av. Kaikan, s/n – Universitário. Teixeira de Freitas-BA. CEP: 45.995-300. Brasil. Tel: 55(73)32638071. Fax: 55(73)32638054; e-mail: [jfortuna@uneb.br](mailto:jfortuna@uneb.br)

## ABSTRACT

The fast and reliable detection of *Salmonella* spp. in foods is increasingly important. Although conventional microbiological analyses are the reference and the most widely used methodologies for that end, the polymerase chain reaction (PCR) technique is today regarded as a sensitive and specific protocol to detect the bacteria. The present study compares the conventional microbiology method, the Salmosyst method and PCR to detect the presence of *Salmonella* spp. in raw beef and chicken and beef mix hamburgers marketed in the city of Niterói, RJ, Brazil. Of the 80 hamburger samples analyzed, 32 (40.0%) were contaminated with *Salmonella* spp., of which 14 (17.5%) were identified only by conventional microbiology, 10 (12.5) only by PCR, and 8 (10.0%) by both methods. Conventional microbiology and PCR produced similar true positive rates, though conventional microbiology was more efficient to detect true negatives. Both beef and chicken and beef mix hamburgers pose health risks. Both methodologies were efficient, proving the usefulness in microbiological monitoring and controlling in the food industry.

**Keywords:** Hamburger; Conventional Microbiology; Salmosyst; PCR; *Salmonella*.

## RESUMO

**Microbiologia convencional, método Salmosyst e reação em cadeia da polimerase: uma comparação na detecção de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus**

O isolamento e identificação de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos em menos tempo e com maior confiabilidade é cada vez mais importante. Embora a análise microbiológica convencional seja a mais utilizada, além de ser o método de referência na detecção de vários microrganismos, hoje a reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada uma técnica sensível e específica nessa finalidade. Este estudo investigou a presença de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus bovino e misto comercializados no município de Niterói-RJ, Brasil,

utilizando e comparando a metodologia microbiológica convencional, a metodologia Salmosyst e a PCR. Das 80 amostras de hambúrgueres crus analisadas, 32 (40,0%) estavam contaminadas pelo microrganismo *Salmonella* spp., das quais 14 (17,5%) foram identificadas somente pelos métodos microbiológicos, 10 (12,5%) somente pelo método da PCR, e oito (10,0%) por ambos os métodos. Os métodos microbiológicos e a PCR apresentaram índices semelhantes de identificação de verdadeiros positivos, porém os métodos microbiológicos foram mais eficientes na detecção de verdadeiros negativos. Tanto os hambúrgueres bovinos quanto os mistos representam risco à saúde dos consumidores. Ambos os testes foram eficientes, provando sua utilidade no monitoramento e controle microbiológico na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** Hambúrguer; Microbiologia Convencional; Salmosyst; PCR; *Salmonella*.

## INTRODUCTION

The detection and identification of bacteria of the genus *Salmonella* in food play an essential role in the prevention of food poisonings outbreaks. However, between 5 and 7 days are required when conventional methods and culture media are used for that end. Additionally, the direct competition between *Salmonella* spp. bacterial cells and other microorganisms may also lead to false positive results. In this sense, speeding up and improving reliability in the detection of these microorganisms in food are increasingly important. New methodologies, among which biomolecular methods, are continuously developed and perfected in the attempt to make microbiological analyses faster and less labor intensive.

A previous study discovered that, as a rule, the reliable detection of *Salmonella* spp. is influenced by how the isolation of the bacteria in foods is conducted (Tortora *et al.*, 2012). Yet, these isolation procedures have a few disadvantages, like the need for specific, selective



and differential culture media, apart from the long time spans to arrive at a diagnosis and/or identify the pathogen. Also, the small *Salmonella* spp. counts in food samples may render the detection of the pathogen more difficult.

Conventional microbiological analyses are still the most commonly used in the detection of microorganisms, and are the reference method appointed by Brazilian legislation. Nevertheless, these analyses are time consuming, since a conclusive diagnosis may take up to seven days to be reached, especially when large numbers of samples are investigated. In this sense, in spite of being standardized and reliable, conventional microbiology is not very practical, mainly in routine food inspection procedures, which approve foods for human consumption based on consistent and fast results.

Currently, tests based on chromophore and/or fluorophore groups (chromogenic and/or fluorogenic media) associated with different types of cell substrates are among the main alternatives in the detection and identification of *Salmonella* bacteria. In this scenario, tests that use the polymerase chain reaction (PCR) are considered today the most promising to detect *Salmonella* spp. genetic material in food samples, which may be viable and therefore culturable. The technique is sensitive and specific to detect several microorganisms, and is used in the analysis of animal products. PCR detects a conserved region of a microorganism's genome, allowing the *in vitro* replication of sequences defined by the DNA of the microorganism studied, that is, only the region amplified by a specific primer (Mullis and Faloona, 1987; Mullis, 1990).

In general, when compared to conventional microbiology methods, PCR is more specific, fast and reliable. However, the technique's main limitation is that it does not differentiate viable from non-viable genetic material, leading to false positive results. In other words, the PCR technique may indicate the presence of the pathogen, even when there is no food poisoning hazard.

This study compares the conventional microbiology method, the Salmosyst method and PCR to detect the presence of *Salmonella* spp. in raw beef and chicken and beef mix hamburgers marketed in the city of Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil.

## **MATERIALS AND METHODS**

This study was conducted in the Laboratory of Microbiological Control of Animal Product and Laboratory of Molecular Epidemiology, Veterinary School, Universidade Federal Fluminense. In total, 80 samples were analyzed, 40 beef hamburgers and 40 hamburgers made with beef and chicken meat. Hamburgers were purchased in local supermarkets and butcher's shops in the city of Niterói, RJ, Brazil, in the original packaging. Hamburgers weighed between 56 g and 120 g. Four hamburgers were considered a sample unit. As of purchase, hamburgers were kept in the original packaging, placed in individual low-density polyethylene bags with hermetic lock, transferred to a portable thermal container and transported to the laboratory for analyses.

### **Microbiological standards**

*Salmonella* spp. prevalence in hamburgers samples was compared with the standards defined in Resolution No. 12, issued by the Board of the National Sanitation Authority (ANVISA), Ministry of Health (Brasil, 2001), which establishes sanitary microbiological standards and interpretation criteria in the microbiological analyses of foods destined for human consumption.

### **Isolation and identification of *Salmonella* spp.**

#### *Conventional microbiology*

The conventional microbiology method used was based on Ordinance No. 62, issued

by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supplies (MAPA), Office for the Protection of Agriculture and Livestock (SDA), which publishes the official analytical methods used in the microbiological analyses of animal products and water (Brasil, 2003).

Initially, 25 g of each sample were placed in a homogenization bag and weighed on a digital precision scale. Then, 225 mL of buffered peptone saline 1% (PBS) were added to bags. Next, samples were homogenized in a stomacher for 60 s at normal speed. Bags were sealed and left at room temperature for 1 h. After that, homogenized samples were incubated in bags in a stove at 35°C for 24 h. For enrichment, samples were inoculated in Selenite-Cystin broth (SC) and Tetrathionate broth (TT) and incubated at 35°C for 24 h. For selective plating, aliquots of SC and TT enrichments were transferred to individual petri dishes containing solid Hektoen Enteric Agar (HE), *Salmonella-Shigella* Agar (SS), Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD) and Differential Salmonella Agar (DSA). All culture media were incubated at 35°C for 18-24 h. Selective plating was carried out in duplicate for each pre-enrichment broth. Typical *Salmonella* spp. colonies were identified based on classical biochemistry methods and serology.

#### *Salmosyst method*

Twenty-five grams of the sample were weighed as described above. Then, 225 mL of Salmosyst Broth Base (SYBB) for pre-enrichment was added and the mixture was homogenized in a stomacher for 60 s at normal speed. The bag was sealed and left at room temperature for 1 h, and incubated at 35°C for 6 h. Selective Salmosyst enrichment was carried out transferring 10 mL of the SYBB to test tubes containing 1 mL Salmosyst Selective Supplement, to become pre-enrichment Selective Supplement broth. Incubation at 35°C for 18 h ensued, after which this broth was streaked on petri dishes containing DSA. Dishes were incubated at 35°C for 18 h. Pink or red colonies were identified based on classical

biochemistry and serology (Pignato *et al.*, 1995).

### *Polymerase chain reaction*

Aliquots (0.7 mL) of the pre-enrichment broth (PBS) used in the conventional microbiology was transferred to sterile polypropylene microtubes 6 h and 24 h after the beginning of incubation for DNA extraction and amplification. Similarly, 0.7-mL aliquots of SYBB was transferred to different sterile polypropylene microtubes 6 h after the beginning of incubation. Aliquots of identical volume of the Selective Supplement Broth were transferred to identical microtubes 24 h after the beginning of incubation. Then, 0.7 mL of glycerol was added to every tube. Contents were stored at -20°C, upon DNA extraction.

The PCR protocol adopted was based on Flôres *et al.* (2001) and Santos *et al.* (2001a and 2001b), in which DNA extraction is carried out by thermal treatment. The PCR reaction was conducted using a pair of primers that amplifies 284 bp, containing the oligonucleotide sequence derived from the *invA* gene: primer 1, *invA* 159: 5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3', and primer 2, *invA* 141: 5' TCA TCG CAC ACG TCA AAG GAC C 3'.

### **DNA extraction**

DNA was extracted using 300 µL aliquots from the microtubes' contents using micropipettes with tips. Aliquots were transferred to new microtubes. After, 300 µL tris-EDTA buffer was added. Contents were homogenized in an automatic shaker for 30 s. Immediately after, microtubes were centrifuged for 30 min at 13,500 rpm and 10°C. The supernatant was discarded and 100 µL of tris-EDTA buffer was added to the remaining 50 µL of the sediment. Contents were then homogenized once again for 10 s in an automatic shaker. After, microtubes were kept on a thermal block at 94°C for 10 min and then immediately

centrifuged for 1 min at 13,500 rpm and 10°C. The supernatant obtained was transferred to new microtubes and kept in a freezer at -20°C for 10 min, prior to DNA amplification.

### **DNA amplification**

PCR reactions were carried out in conic 200- $\mu$ L polypropylene microtubes containing 4.4  $\mu$ L ultrapure water, 5.0  $\mu$ L 10X buffer, 5.0  $\mu$ L  $MgCl_2$  50 mM, 5.0  $\mu$ L dNTP mix (25  $\mu$ M each nucleotide), 1.0  $\mu$ L (100  $\mu$ mol) primer 1, 1.0  $\mu$ L (100  $\mu$ mol) primer 2, 1.2  $\mu$ L bovine serum albumin (BSA) 400  $\mu$ g/mL, 0.4  $\mu$ L *Taq* DNA polymerase (2.0 U) and 2.0  $\mu$ L of purified sample DNA, to a final volume of 25.0  $\mu$ L. *Salmonella* Enteritidis DNA (2.0  $\mu$ L) was used as positive control, and ultrapure water (2  $\mu$ L) was used as negative control. Amplification conditions were as follows: one 5-min cycle at 94°C (denaturation), 35 cycles of 30 s at 94°C (denaturation), 30 s at 54°C (annealing) and 30 s 72°C (extension), and a final 7-min extension cycle at 72°C. after amplification, the total reaction volume was electrophoresed on agarose gels 1.5% in tris/borate/EDTA (TBE) 0.5X stained with 5.5 mg/mL ethidium bromide. Amplified fragments were visualized in a UV transilluminator and photodocumented.

### **Statistical analysis**

Results of microbiological analyses (conventional microbiology and Salmosyst method) and PCR were compared by the chi-square test at 95% ( $\alpha=0.05$ ) and 99% ( $\alpha=0.01$ ) significance level (df=5). Concordance in the detection of *Salmonella* spp. in hamburgers using the different methods was assessed using the McNemar test. All statistical analyses were carried out in the BioStat™ 3.0 software, version 2003 (Ayres *et al.*, 2003).

## **RESULTS**

All samples analyzed were previously inspected by federal sanitation authorities. Of the 80 samples analyzed, 32 (40%) were contaminated with *Salmonella* spp., and were thus inappropriate for human consumption, as established in Resolution No. 12, issued by the Board of the National Sanitation Authority (ANVISA), Ministry of Health (Brasil, 2001). Of these, 14 (17.5%) were identified as positive for the microorganism only by conventional microbiology and the Salmosyst methods, while 10 (12.5%) were positive in the PCR protocol and eight (10%) were positive using both analyses (Figure 1).

More specifically, when conventional microbiology and the Salmosyst method are compared, *Salmonella* spp. was detected in 17 (21.25%) and 11 (13.75%) samples, respectively, while PCR identified 18 (22.5%) samples contaminated with the pathogen (Table 1). Only three (7.5%) of the samples were shown to contain the microorganism using the three methods.

No statistically significant difference was observed in the detection of *Salmonella* spp. using the three methods in terms of the type of hamburger analyzed (beef and a beef and chicken mix) using the chi-square test ( $\chi^2=3.209$ ,  $p=0.6679$ , below significance values  $\alpha=0.01$ , 15.09, and  $\alpha=0.05$ , 11.07). In other words, the detection of *Salmonella* spp. was not influenced by the method used or type of hamburger.

As for the PCR analysis, eight (10%) samples were positive for *Salmonella* spp. using the classical pre-enrichment broth (PBS) for a 24-h incubation period, eight (10%) using the Selective Salmosyst Supplement enrichment broth for a 24-h incubation period, and two (2.5%) using both broths (Table 2).

No statistically significant difference was observed between detection of *Salmonella* spp. using conventional microbiology, PCR using PBS culture, PCR using Selective Salmosyst Supplement enrichment broth ( $\chi^2=3.333$ ,  $p=0.3430$ , below significance values  $\alpha=0.01$ , 15.09, and  $\alpha=0.05$ , 7.81). The detection of *Salmonella* spp. was not influenced by the

method used.

When PCR results are individually compared with conventional microbiology and the Salmosyst method, the McNemar test showed no statistically significant difference in the power to detect *Salmonella* spp. (1.7413,  $p=0.1904$  and 0.0,  $p=1.0$ , respectively, below the significance levels  $\alpha=0.01$ , 6.64, and  $\alpha=0.05$ , 3.84).

Concerning sensitivity, microbiological methods were poorly sensitive to detect *Salmonella* spp. in raw hamburgers (36.36%), which may increase the risk of false negative results. However, these methods were highly specific (82.76%), indicating the capacity to characterize negative results more efficiently. In turn, PCR presented low sensitivity (44.44%) and average specificity (77.42%). Precision for both methods was 70%.

## DISCUSSION

Microbiological methods and PCR performed similarly concerning the identification of true positive *Salmonella* spp. in raw hamburgers. However, the microbiological methods were more efficient at identifying true negatives. As regards precision, both methods yielded acceptable results to detect *Salmonella* spp.

As observed in the present study, the importance of pre-enrichment has been underlined in the detection of *Salmonella* spp. In a previous study, of 30 chicken carcasses analyzed, five (16.7%) were positive for the bacteria (Rissato *et al.*, 2011). The authors also observed that the sensitivity of the PCR technique after pre-enrichment and a 24-h incubation period was 3.3 % (1/30), and increased to 16.7% (5/30) in samples incubated for 48 h. In another study, Mynt *et al.* (2003) observed that when pre-enrichment was not used, the PCR technique did not detect *Salmonella* spp. Nevertheless, sensitivity increased to 79% when pre-enrichment was used. This increase in PCR sensitivity with pre-enrichment was also reported in other papers (Crocì *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2001b).

Additionally, the advantages of pre-enrichment in the detection of microorganisms by PCR were elegantly discussed in a study that reported that pre-enrichment broths are usually inexpensive, are not labor-intensive, dilute substances that may inhibit the PCR and increase the number of viable bacterial cells (Stone *et al.*, 1995). Also, for Cheung and Kam (2012) pre-enrichment allows multiplying the bacterial cells in the sample, improving detection of *Salmonella* spp. This step reduces the chances of amplifying sequences of dead cells present in the sample.

In a study that compared the conventional microbiological isolation procedure with PCR in the detection of *Salmonella* spp. in experimentally challenged calves, Silva *et al.* (2011) concluded that the conventional method was more effective than PCR to detect *Salmonella* Typhimurium, as revealed by the McNemar test. Similarly, Oliveira *et al.* (2003) state that the PCR carried out with non-selective pre-enrichment was the least sensitive to generically detect *Salmonella*, compared to the conventional method.

In turn, Rall *et al.* (2009) investigated the presence of *Salmonella* spp. in 50 samples of chicken and 75 samples of fresh sausages, and observed that 27 (54%) of the chicken samples were positive in the PCR and only four (8%) were positive for the microorganisms in the conventional methodology. In sausage samples, 42 (56%) and seven (9.3%) were positive for *Salmonella* spp. using the PCR and conventional methods, respectively. The authors also observed that PCR was more sensitive than conventional microbiology.

Here, the percentage prevalence of *Salmonella* spp., assessed using both microbiological methods and the PCR technique, differed from the findings reported in previous studies. In a paper reporting the presence of *Salmonella* spp. in 300 chicken meat samples, Dickel *et al.* (2005) observed 170 (56.6%) and 225 (75%) positive samples using the conventional methodology and PCR, respectively. In a study that investigated the presence of *Salmonella* spp. in 98 samples of a variety of foods, Kawasaki *et al.* (2001) reported that 27



(37.76%, 42 (42.86%) and 34 (34.69%) were positive for the bacteria using conventional microbiology, PCR, and both methods, respectively. Analyzing 268 pork samples, Castagna *et al.* (2005) reported the presence of *Salmonella* spp. in 54 samples (20.15%) using the PCR, 42 (15.67%) using the conventional methodology, and 39 (14.55%) using both methods. However, none of these studies analyzed raw beef or beef and chicken hamburgers. These differences reported for the efficiency of the PCR protocol and conventional methods to detect *Salmonella* spp. in foods point to the importance of further studies to shed more light on how far a given type of sample may influence the sensitivity and specificity of these techniques.

In conclusion, both beef and beef and chicken hamburgers pose a health hazard, indicating the need for improvement in inspection routines and sanitary control of these products to reduce the contamination by *Salmonella* spp. as well as other pathogenic microorganisms. The results obtained in the present study suggest that more than one detection method may make the detection of *Salmonella* spp. in hamburgers more reliable. Also, the three analysis approaches used were efficient, and are useful in the microbiological monitoring and control of contamination sources in the food industry.

## REFERENCES

- AYRES, M., AYRES Jr, M., AYRES, DL., and SANTOS AS., 2003. BioEstat 3.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. CNPq: Brasília.
- BRASIL., 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.
- BRASIL., 2001. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Estabelece os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos e Determina os Critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano.
- CASTAGNA, SMF., MULLER, M., MACAGNAN, M., RODEMBUSCH, CR., CANAL, CW. and CARDOSO, M., 2005. Detection of *Salmonella* spp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. *Brazilian Journal of Microbiology*. vol. 36, p. 373-377.
- CHEUNG, P. and KAM, KM., 2012. *Salmonella* in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods. *Food Research International*. vol. 45, p. 802-808.
- CROCI, L., DELIBATO, E., VOLPE, G., DE MEDICI, D. and PALLESCHI G., 2004. Comparison of PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standard culture method for detecting *Salmonella* in meat products. *Applied Environmental Microbiology*. vol. 70, no. 3, p. 1393-1396.
- DICKEL, EL., RODRIGUES, LB., SANTOS, LR., VALLE, SF., PILOTTO, F., RODEMBUSCH, C., WALD, VB., CANAL, CW. and NASCIMENTO, VP., 2005. Análise

comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. Revista Brasileira de Ciência Veterinária. vol. 12, p. 5-10.

FLÔRES, ML., NASCIMENTO, VP., KADER, IITA., SANTOS, LR., PONTES, AP., SALLE, CTP. and LOPES, RFF., 2001. Métodos de extração de DNA para a detecção de *Salmonella* em ovos de galinhas com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. Ciência Rural. vol. 31, no. 2, p. 315-318.

KAWASAKI, S., KIMURA, B. and FUJII, T., 2001. Comparison of TaqMan<sup>TM</sup> *Salmonella* amplification/detection kit with standard culture procedure for detection of *Salmonella* in meat samples. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. vol. 42, no. 1, p. 33-39.

MULLIS, KB. and FALOONA, FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology. vol. 155, p. 335-350.

MULLIS, KB., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American. April, p. 56-65.

MYNT, MS., JOHSON, YJ., TABLANTE, NL. and HECKERT, RA., 2003. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. Food of Microbiology. vol. 23, p. 599-604.

OLIVEIRA, SD., RODENBUSCH, CR., CÉ, MC., ROCHA, SLS. and CANAL, CW., 2003. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. Letters Applied Microbiology. vol. 36, p. 217-221.

PIGNATO, S., MARINO, AM., EMANUELLE, MC., IANNOTTA, V., CARACAPPA, S. and GIAMMANCO, G., 1995. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of Salmonellae in foods. Applied Environmental Microbiology. vol. 16, no 5, p. 1996-1999.

RALL, VLM., MARTIN, JGP., CANDEIAS, JMG., CARDOSO, KFG., SILVA, MG., RALL, R. and ARAÚJO Jr, JP., 2009. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e linguças comercializadas na cidade de Botucatu. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. vol. 46, no. 3, p. 167-174.

RISSATO, DP., BORGIO, AP., MOREIRA, JP., BAPTISTA, F., CONTI, ACM. and RIBEIRO, AB., 2011. Detecção de *Salmonella* spp. em água de lavagem de carcaças de frango utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR). *Revista Saúde Pesquisa*. vol. 4, no. 1, p. 35-39.

SANTOS, LR., NASCIMENTO, VP., OLIVEIRA, SD., FLÔRES, ML., PONTES, AP., PILOTTO, F., NEVES, N., SALLE, CTP. and LOPES, RFF., 2001a. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. vol. 29, no. 2, p. 87-92.

SANTOS, LR., NASCIMENTO, VP., OLIVEIRA, SD., FLÔRES, ML., PONTES, AP., PILOTTO, F., NEVES, N., SALLE, CTP. and LOPES, RFF. 2001b. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. vol. 43, no. 5, p. 247-250.

SILVA, DG., ÁVILA, LG., BERG, R., SILVA, DR., CONDE, SO., LEMOS, MVF. and FAGLIARI, JJ., 2011. Comparação do isolamento microbiológico e de reação em cadeia da polimerase no diagnóstico de salmonelose em bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Typhimurium. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. vol. 63, no. 5, p. 1241-1245.

STONE, GG., OBERST, RD., HAYS, MP., MCVEY, S., GALLAND, JC., CURTIS III, R., KELLY, SM. and CHENGAPPA, MM., 1995. Detection of *Salmonella typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR-hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 33, no. 5, p. 1292-1295.

TORTORA, GJ., FUNKE, BR. and CASE, CL., 2012. Microbiologia. 10. ed. Artmed: Porto Alegre.

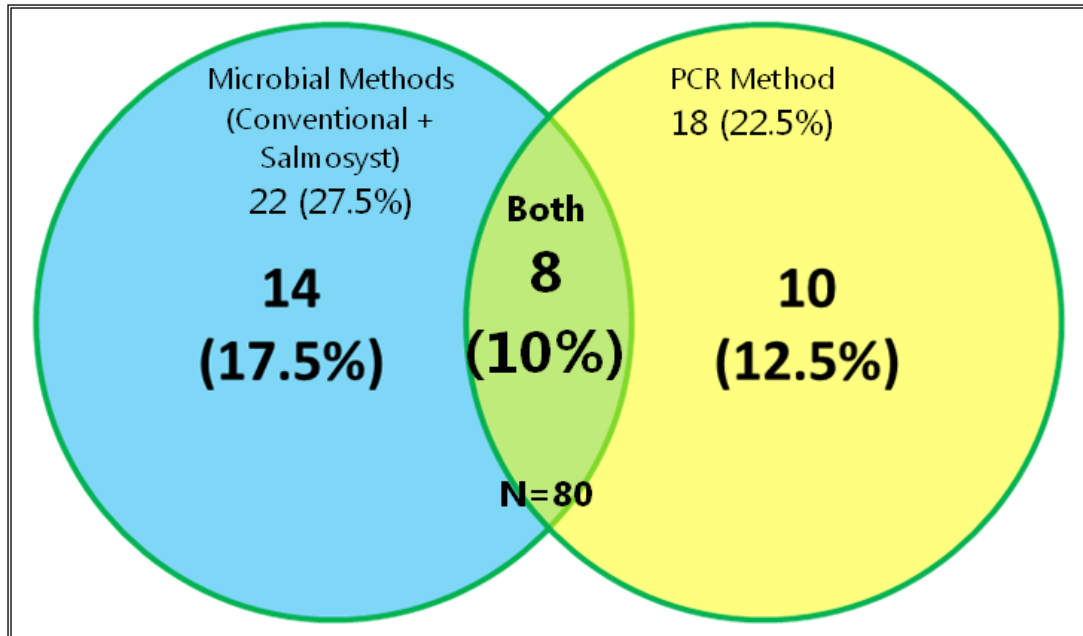
## LEGENDAS

**Figure 1.** Number of samples positive for *Salmonella* spp. using the conventional microbiology methods, Salmosyst method and PCR.

**TABLE 1.** Positive *Salmonella* spp. samples using the conventional microbiology, Salmosyst method and PCR for beef and chicken and beef hamburgers.

**TABLE 2.** Positive *Salmonella* spp. samples using the microbiological methods (conventional and Salmosyst) and PCR.

## FIGURE



**Figure 1.** Number of samples positive for *Salmonella* spp. using the conventional microbiology methods, Salmosyst method and PCR.

## TABLES

**TABLE 1.** Positive *Salmonella* spp. samples using the conventional microbiology, Salmosyst method and PCR for beef and chicken and beef hamburgers.

Hamburger type	Conventional microbiology		Salmosyst		PCR	
	<i>Salmonella</i> (+)	<i>Salmonella</i> (-)	<i>Salmonella</i> (+)	<i>Salmonella</i> (-)	<i>Salmonella</i> (+)	<i>Salmonella</i> (-)
Beef	9	31	3	37	8	32
Chicken and beef	8	32	8	32	10	30
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>63</b>	<b>11</b>	<b>69</b>	<b>18</b>	<b>62</b>

**TABLE 2.** Positive *Salmonella* spp. samples using the microbiological methods (conventional and Salmosyst) and PCR.

Results	Microbiology Methods		PCR	
	Conventional microbiology	Salmosyst	Pre-enrichment broth used in conventional microbiology (24 h)	Pre-enrichment broth used with Salmosyst selective supplement (24 h)
<i>Salmonella</i> spp. positive	17 (21.25%)	11 (13.75%)	10 (12.5%)	10 (12.5%)
<i>Salmonella</i> spp. negative	63 (78.75%)	69 (86.25%)	70 (87.5%)	70 (87.5%)
<b>TOTAL</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>80</b>



# COMPARAÇÃO ENTRE A SOROLOGIA E O SISTEMA BACTRAY® NA IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. EM HAMBÚRGUERES CRUS

## COMPARISON BETWEEN THE SEROLOGY AND THE BACTRAY™ SYSTEM IN THE IDENTIFICATION OF *Salmonella* spp. IN RAW HAMBURGERS

Jorge Luiz FORTUNA<sup>1</sup>; Elmiro Rosendo do NASCIMENTO<sup>2</sup>; Robson Maia FRANCO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Laboratório de Microbiologia. Campus X. Curso de Ciências Biológicas. Av. Kaikan, s/n – Universitário. Teixeira de Freitas-BA. CEP: 45.995-300. Brasil. Tel: 55(73)32638071. Fax: 55(73)32638054; E-mail: [jfortuna@uneb.br](mailto:jfortuna@uneb.br). Programa de Pós-Graduação (Doutorado) de Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal Fluminense (UFF).

<sup>2</sup> Universidade Federal Fluminense (UFF). Faculdade de Veterinária. Niterói-RJ. Brasil. Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Salmonella*; Hambúrguer; Sorologia; Bactray.

### INTRODUÇÃO

O hambúrguer é um produto cárneo industrializado, obtido da carne moída de animais de açougue, com adição ou não de tecido adiposo e outros ingredientes (BRASIL, 2000). Segundo Lima e Oliveira (2005) e Tavares e Serafini (2006), este produto é submetido a um processo de manipulação excessiva com problemático sistema de conservação, o que favorece a instalação e a veiculação de patógenos. Sendo assim, torna-se necessária a avaliação de sua qualidade higiênicosanitária do ponto de vista microbiológico a fim de garantir que o consumo ocorra de forma segura e livre de patógenos.

As técnicas utilizadas, para a pesquisa de microrganismos, aplicadas na cadeia produtiva dos alimentos de origem animal, têm como objetivo principal diminuir os riscos de causar doenças alimentares aos consumidores destes alimentos, além de testar a qualidade destes produtos comercializados.

O gênero *Salmonella* representa um dos mais importantes grupos de bactérias patogênicas presentes nos alimentos, principalmente os de origem animal, e um dos principais responsáveis por causar infecções alimentares. Além disso, os surtos de salmoneloses constituem um desafio às indústrias alimentícias e aos órgãos de Saúde Coletiva, sendo o hambúrguer um dos alimentos mais frequentemente relacionado a estes surtos.

O isolamento e identificação de *Salmonella* spp., em menor espaço de tempo e maior confiabilidade em amostras de alimentos, tem se tornado cada vez mais importante, tanto que novas técnicas estão sempre sendo testadas e desenvolvidas na tentativa de facilitar e agilizar estes diagnósticos microbiológicos.

Tortora et al (2012), descreveram que o diagnóstico geralmente depende de isolar a *Salmonella* spp. do alimento. Este isolamento requer meios de cultura específicos, seletivos e diferenciais, sendo relativamente lentos para se chegar ao diagnóstico e/ou identificação do patógeno. Além disso, a pequena quantidade de *Salmonella* spp. encontrada nos alimentos representa um problema para a detecção da bactéria.

A prova de soroprecipitação fundamenta-se na reação antígeno-anticorpo, com consequente aglutinação do antígeno frente ao anti-soro para *Salmonella* spp. polivalente O (BRASIL, 2003), enquanto que o sistema Bactray® é destinado à identificação bioquímica de bacilos Gram-negativos com oxidase negativa, fermentadores da glicose ou não e bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose, com oxidase positiva. Este sistema é composto por três conjuntos de provas bioquímicas, denominados Bactray® I, II e III (LABORCLIN, 2009). Neste trabalho utilizou-se o Bactray® I e II para identificação de fermentadores da glicose e bactérias não-fermentadoras oxidase negativas.

Objetivou-se neste trabalho comparar os resultados obtidos em provas bioquímicas utilizando Bactray® I e II com os resultados obtidos com a sorologia para a identificação de cepas de *Salmonella* spp. provenientes do meio TSI, após resultados bioquímicos (triagem primária e triagem secundária) característicos do microrganismo.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, onde foram analisadas 80 amostras de hambúrgueres adquiridas no comércio formal (supermercados e/ou açougues) do município de Niterói-RJ.

O método empregado para as análises microbiológicas de isolamento e identificação de *Salmonella* spp. foi baseado na Instrução Normativa (IN) nº 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal (BRASIL, 2003).

Os resultados das análises de pesquisa de *Salmonella* spp. em carne de hambúrgueres foram comparados com o padrão nacional, baseado na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, do Ministério da Saúde (MS); Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), onde consta os padrões microbiológicos sanitários para alimentos e são determinados os critérios para a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2001).

Foi pesada, em balança digital de precisão, e em saco para homogeneização, em condições de esterilidade, 25 g da amostra na qual foi adicionada 225 mL de Solução Salina Peptonada 1% Tamponada (SSPT). Após, foi homogeneizado por 60 segundos no "Stomacher" em velocidade normal. Fechou-se hermeticamente o saco contendo a amostra e a SSPT e incubou em estufa a temperatura de 36°C/24 horas.

A partir do procedimento do pré-enriquecimento, foi inoculado, simultaneamente para cada amostra, nos meios líquidos seletivos, Caldo Selenito Cistina (SC) e Caldo Tetrionato (TT). Utilizando-se pipetas esterilizadas foram transferidas alíquotas de 1,0 mL para tubo contendo 10,0 mL de Caldo SC e 1,0 mL para tubo contendo 10,0 mL de Caldo TT. Todos foram incubados a 36°C/24 horas.

A partir dos caldos seletivos de enriquecimento, repicou-se sobre a superfície previamente seca de placas de Petri com cada meio sólido seletivo de escolha, estriando de forma a se obter UFC isoladas com o auxílio de alça bacteriológica. Foram obtidas duas placas para cada meio de cultura de escolha, uma originária do Caldo SC e outra do Caldo TT. Os meios sólidos escolhidos foram: Ágar Hektoen (HE); Ágar *Salmonella-Shigella* (SS); Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar *Salmonella* Diferencial (ASD). Todas os meios foram incubados em estufa bacteriológica a 36°C/18-24 horas.

Foram escolhidas três UFC típicas de cada placa de Petri do plaqueamento seletivo, que foram repicadas para Ágar Nutriente (AN) e incubadas a 36°C/18-24 horas. De cada tubo de ensaio de AN foram transferidas UFC para dois diferentes tubos contendo, respectivamente, Ágar Três Açúcares Ferro (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA), que foram incubados em estufa bacteriológica a 36°C/24 horas. Esta fase foi denominada de Triagem Primária.

A partir dos tubos utilizados na triagem primária (TSI e LIA), com leitura do meio de cultura típico para *Salmonella* spp., foram repicados, utilizando a agulha bacteriológica, para tubos contendo AN e incubadas a 36°C/18-24 horas.

De cada tubo de ensaio de AN foram transferidas UFC para tubos contendo meios de cultura que evidenciaram as características fenotípicas e metabólicas das culturas suspeitas por meio da verificação da produção da Urease (Caldo Ureia) e desaminação da Fenilalanina (Ágar Fenilalanina), sendo esta fase denominada de Triagem Secundária.

Semeou-se maciçamente UFC em tubos de ensaio contendo 3,0 mL de Caldo Ureia e incubou-se a 36°C/24 horas. Foi observada a coloração do meio. A manutenção da cor inicial do meio indicou que não ocorreu hidrólise da ureia. A alteração para rosa foi indicativa de alcalinização do meio devido à ação da urease sobre a ureia. A *Salmonella* spp. não produz a urease.

Inoculou-se a superfície do bisel do Ágar Fenilalanina por estriamento e incubou-se a 36°C/24 horas. Para a leitura, foi adicionado duas a três gotas de solução de Cloreto Férrico a 10%. A alteração de coloração da cultura na superfície do bisel para verde indicou reação de desaminação da Fenilalanina. *Salmonella* spp. não desamina a fenilalanina.

Foi ressuspendido o cultivo obtido em AN em aproximadamente 2,0 mL de Solução Salina 0,85%. Em lâmina de vidro foi depositado separadamente uma gota de Solução Salina 2% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente O, diretamente do frasco. Em seguida, acrescentou-se a cada uma delas uma gota da suspensão teste. Com movimentos circulares, realizou-se a leitura com iluminação sobre o fundo escuro em um a dois minutos, classificando a reação do seguinte modo: positiva (presença de aglutinação somente na mistura cultivo mais anti-soro); negativa (ausência de aglutinação em ambas as misturas); e não específica (presença de aglutinação em ambas as misturas).

Para a identificação das *Salmonella* spp. isoladas também foi utilizado o sistema comercial Bactray<sup>®</sup> I e II, indicado para bacilos Gram-negativos fermentadores e oxidase negativa. Os procedimentos foram realizados conforme recomendações do fabricante. Inicialmente, a UFC obtida em cultivo de 18-24 horas em AN foi suspensa em água destilada esterilizada até a turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Desta suspensão foi transferido 1,0 mL para o conjunto de análise Bactray<sup>®</sup> I, distribuindo o volume entre os compartimentos que contém os reagentes desidratados para realização das provas de: hidrólise de  $\alpha$ -galactosidase (ONPG) e da arginina (ADH); descarboxilação da lisina (LDC) e da ornitina (ODC), produção de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), indol (IND) e urease (URE); utilização da glicose e produção de acetoina (VP1), desaminação da fenilalanina (PD); e utilização do citrato como única fonte de carbono (CIT); e 1,0 mL para o conjunto de análise Bactray<sup>®</sup> II, que é considerado complementar ao Bactray<sup>®</sup> I, para a realização das provas de: utilização do malonato, raminose, adonitol, salicina, arabinose, inositol, manitol e rafinose. O óleo mineral esterilizado foi adicionado as provas de ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S e URE e os conjuntos foram incubados a 36°C/24 horas.

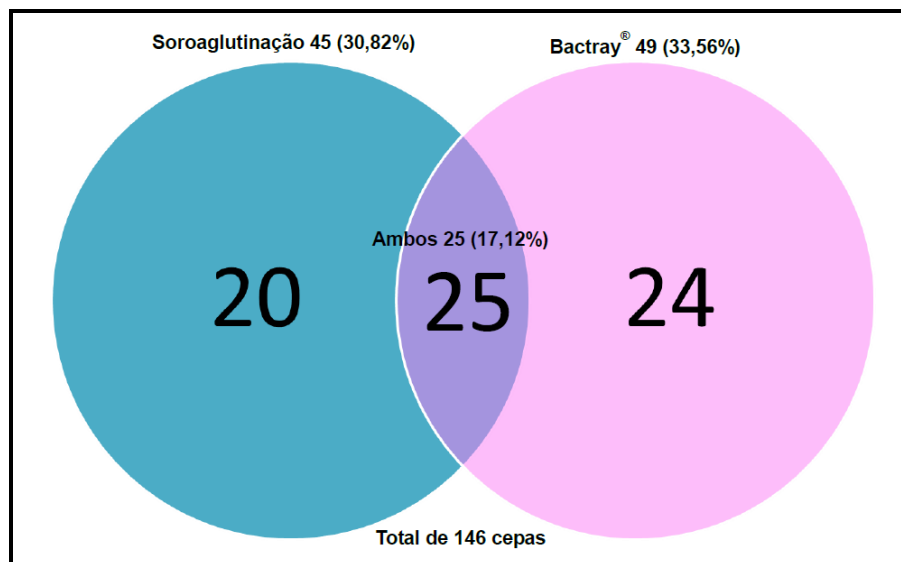
Após a incubação foi adicionado os reagentes ( $\alpha$ -naftol e hidróxido de potássio no VP, cloreto férrico no PD e reativo de Kovac's no IND) para a realização da leitura por meio da mudança de cor nos compartimentos. Os dados foram adicionados a uma planilha eletrônica componente do conjunto de análise. A identificação da espécie foi realizada pelo programa eletrônico ("software"), que também forneceu a porcentagem de confiança da identificação realizada.

A fim de se comprovar a existência da concordância dos resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres, através dos dois métodos utilizados (sorologia e sistema Bactray<sup>®</sup>), realizou-se o teste de McNemar. Para se testar os níveis de sensibilidade, especificidade e precisão dos métodos usados neste estudo, utilizou-se os testes diagnósticos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 80 amostras de hambúrgueres analisadas, todas devidamente inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), 22 (27,5%) apresentaram-se contaminadas pelo microrganismo *Salmonella* spp., estando assim em condições sanitárias insatisfatórias e impróprias para o consumo humano.

Das 146 cepas analisadas pela sorologia, 45 (30,82%) apresentaram resultado positivo para a identificação de *Salmonella* spp., enquanto que as cepas analisadas pelo sistema Bactray<sup>®</sup> I e II, 49 (33,56%) foram identificadas como *Salmonella* spp. Do total das 146 cepas testadas, 25 (17,12%) foram identificadas como *Salmonella* spp. em ambos os métodos (**Figura 1**).



**Figura 1.** Resultados positivos para a identificação de *Salmonella* spp. em hambúrgueres utilizando a sorologia e o sistema Bactray®.

Em estudo realizado por Bezerra et al (2010), que pesquisou a presença de *Salmonella* spp. em 105 amostras de sanduíches de hambúrgueres em Cuiabá-MT, através de sorologia após a triagem bioquímica, não foi encontrada contaminação em nenhuma das amostras. Esse mesmo resultado também aconteceu em pesquisa feita por Santa et al (2012), onde foram analisadas 50 amostras de salames de diferentes pequenas indústrias. Porém na metodologia utilizou-se o sistema Bactray® I e II para a identificação bioquímica de *Salmonella* spp.

O valor calculado pelo teste de McNemar foi de 0,2045 ( $p=0,6511$ ), sendo menor que os tabelados para o nível de significância  $\alpha=0,01$  (6,64) e  $\alpha=0,05$  (3,84), concluindo-se que há concordância nos resultados de identificação de *Salmonella* spp. em hambúrgueres entre os dois diferentes métodos utilizados na investigação.

Nos resultados obtidos, em relação aos testes diagnósticos, ocorreu a indicação de que a sorologia para a identificação de *Salmonella* spp. possuíam médios valores de sensibilidade (51,02%) e alta especificidade (79,38%) e que no sistema Bactray® I e II também foram encontrados valores semelhantes de sensibilidade (55,56%) e de especificidade (76,24%) em relação a sorologia. Ambos os métodos foram caracterizados com precisão de 69,86%.

## CONCLUSÃO

A sorologia foi considerada como sendo a melhor capacidade de identificar os verdadeiros positivos, enquanto que o sistema Bactray® I e II foi indicado com melhor capacidade de identificar os verdadeiros negativos. Quanto à precisão, os dois métodos foram considerados como satisfatórios quanto a pesquisa e identificação de *Salmonella* spp. em hambúrgueres. Verificou-se que com a utilização de mais de um tipo de método de identificação, maior a chance de detecção de *Salmonella* spp.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEZERRA, A. C. D.; REIS, R. B.; BASTOS, D. H. M. Microbial quality of hamburgers sold in the streets of Cuiabá-MT, Brazil and vendor hygiene-awareness. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 30, n. 2. 2010, p. 520-524.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 20*, de 31 de julho de 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndegas, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 62*, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12*, de 02 de janeiro de 2001. Estabelece os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos e Determina os Critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano.

LABORCLIN. Sistema Bactray. Manual de Técnicas. *Laborclin Produtos para Laboratório Ltda.* [online]. Disponível em: <<http://www.laborclin.com.br>> Capturado em: 19 de novembro de 2009.

LIMA, J. X.; OLIVEIRA, L. F. O crescimento do restaurante *self-service*: aspectos positivos e negativos para o consumidor. *Revista Higiene Alimentar*. v. 19, n. 128. 2005, p. 45-53.

SANTA, O. R. D.; ALVAREZ, D. C.; SANTA, H. S. D.; ZANETTE, C. M.; FREITAS, R. J. S.; MACEDO, R. E. F.; TERRA, N. N. Microbiota of sausages obtained by spontaneous fermentation produced in the South of Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 32, n. 4. 2012 (ahead of print), p. 0-0. [Online]. Disponível: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000117>> Capturado: 11/12/2012.

TAVARES, T. M.; SERAFINI, A. B. Carnes de hambúrgueres prontas para consumo: aspectos legais e riscos bacterianos. *Revista de Patologia Tropical*. v. 35, n. 1. 2006, p. 1-21.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed. 2012, 934 p.

Autor a ser contatado: JORGE LUIZ FORTUNA. Universidade do Estado da Bahia (UNEB) – Campus X – Laboratório de Microbiologia – Av. Kaikan, s/n – Universitário, Teixeira de Freitas-BA, CEP: 45-995-300. Email: [jfortuna@uneb.br](mailto:jfortuna@uneb.br).

**CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS  
EM HAMBÚRGUERES CRUS E SUAS RESPECTIVAS TEMPERATURAS DE  
ARMAZENAMENTO**

*COUNT OF HETEROTROPHIC MESOPHILIC AEROBIC BACTERIAL IN RAW  
HAMBURGERS AND RESPECTIVES STORAGE TEMPERATURES*

**Jorge Luiz FORTUNA<sup>1</sup>; Elmiro Rosendo do NASCIMENTO<sup>2</sup>; Robson Maia  
FRANCO<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Laboratório de Microbiologia. Campus X. Curso de Ciências Biológicas. Av. Kaikan, s/n – Universitário. Teixeira de Freitas-BA. CEP: 45.995-300. Brasil. Tel: 55(73)32638071. Fax: 55(73)32638054; e-mail: [jfortuna@uneb.br](mailto:jfortuna@uneb.br). Programa de Pós-Graduação (Doutorado) de Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal Fluminense (UFF).*

<sup>2</sup>*Universidade Federal Fluminense (UFF). Faculdade de Veterinária. Niterói-RJ. Brasil. Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.*

Título resumido: **BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS EM HAMBÚRGUERES**

Endereço completo do autor correspondente:

**JORGE LUIZ FORTUNA**

Universidade do estado da Bahia (UNEB) – Campus X

Curso de Ciências Biológicas – Laboratório de Microbiologia

Av. Kaikan, s/n – Campus X – Universitário

Teixeira de Freitas-BA

CEP: 45.995-300

Tel: 55(73)3263-8071 / Fax: 55(73)3263-8054

E-mail: [jfortuna@uneb.br](mailto:jfortuna@uneb.br)

**CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS  
EM HAMBÚRGUERES CRUS E SUAS RESPECTIVAS TEMPERATURAS DE  
ARMAZENAMENTO**

*COUNT OF HETEROTROPHIC MESOPHILIC AEROBIC BACTERIAL IN RAW  
HAMBURGERS AND RESPECTIVES STORAGE TEMPERATURES*

**RESUMO**

A contagem padrão em placas de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas é utilizada para verificar a qualidade higienicossanitária dos alimentos. Objetivou-se, neste trabalho, enumerar bactérias aeróbias mesófilas em hambúrgueres comercializados no comércio formal do município de Niterói-RJ; mensurar as temperaturas dos balcões frigoríficos de exposição e dos hambúrgueres crus expostos nestes balcões; e determinar o coeficiente de correlação dos resultados encontrados. Foram coletadas 80 amostras de hambúrgueres. O método utilizado foi de semeadura em profundidade (“pour plate”). Dos 80 hambúrgueres analisados, 43 (53,75%) tiveram contagem acima da recomendada, indicando uma baixa qualidade higienicossanitária destes produtos.

**Palavras-chave:** Hambúrguer; Aeróbios Mesófilos; Temperatura.

**SUMMARY**

*Standard plate count of mesophilic aerobic bacteria indicates the hygienic-sanitary quality of the food. This study aimed to enumerate mesophilic aerobic bacteria in hamburgers sold in formal trade of Niterói-RJ; identifying measured temperatures of refrigerated counters and the temperatures of raw hamburgers exposed in counters; and determining the correlation coefficient of results. Was collected 80 samples of hamburgers. Used the method of seeding depth (pour plate). Of the 80 burgers analyzed, 43 (53.75%) had counts above the recommended indicating low quality of these products.*

**Key words:** Hamburger; Mesophilic Aerobic; Temperature.

## INTRODUÇÃO

A contagem padrão em placas de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM) indica a qualidade higienicossanitária dos alimentos. Segundo Silva et al<sup>16</sup>, no uso desta técnica não há diferenciação dos tipos de bactérias, sendo utilizada para a obtenção de informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de fabricação, qualidade das matérias primas utilizadas, condições de processamento, qualidade de manipulação e validade comercial do produto. A CBHAM torna-se útil na avaliação da qualidade do produto, pois populações altas de bactérias podem estar relacionadas às deficiências na sanitização ou falha no controle do processo ou dos ingredientes.

Mesmo que microrganismos patogênicos não estejam contaminando o alimento e que não tenha nenhuma alteração sensorial, o número elevado de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM) leva a suspeitar-se que o alimento encontra-se impróprio para o consumo. Exceto nos alimentos fermentados<sup>3</sup>. Além disso, a utilização de CBHAM possibilita a detecção do número de bactérias heterotróficas aeróbias ou facultativas e mesófilas presentes em um alimento tanto na forma vegetativa quanto na esporulada<sup>17</sup>.

A CBHAM elevada em alimentos geralmente leva a interpretação de que esteja ocorrendo problemas no armazenamento em relação ao binômio tempo-temperatura; matérias-prima excessivamente contaminadas; limpeza e desinfecção em superfícies inadequadas e higiene inadequada na produção do alimento<sup>3, 16, 17</sup>.

A CBHAM constitui um dos melhores indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade higienicossanitária dos alimentos. Sendo assim, este método deveria ser usado para análises microbiológicas de hambúrgueres crus, com objetivo de identificar deficiências na sanitização, problemas no processamento ou em ingredientes na indústria, a fim de diminuir a carga microbiana do produto cru<sup>12</sup>.



Não há legislação em relação ao padrão microbiológico para CBHAM em hambúrgueres. Porém, Silva et al<sup>16</sup> e Morton<sup>10</sup> descreveram que o número máximo dessa microbiota, em carne moída crua, não deve ultrapassar  $1,0 \times 10^5$  UFC/g.

A CBHAM é o método mais utilizado para determinar o número de células viáveis ou Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em uma matriz e/ou produto alimentar. No uso deste método, porções de amostras de alimentos são homogeneizadas, diluídas serialmente em um diluente apropriado, plaqueados sobre a superfície do meio – Método “Spread Plate” – ou dentro de um meio adequado – Método “Pour Plate” – o qual é incubado sob temperatura apropriada por um determinado tempo, sendo então todas as colônias visíveis contadas<sup>6</sup>. Transcorrido o tempo de incubação, considera-se para contagem, somente as placas que apresentarem de 30 a 300 UFC. Multiplica-se pelo respectivo fator de diluição e expressa-se o resultado em UFC por grama da amostra (UFC/g)<sup>17</sup>.

O comércio varejista de produtos cárneos é a última parte da cadeia comercial entre a produção (produtor) e o consumo (consumidor) representando um ponto crítico importante no que diz respeito ao controle higienicossanitário de manuseio e armazenamento destes produtos.

Segundo a própria indicação contida nos rótulos dos hambúrgueres, o produto deve ser armazenado a uma temperatura de até  $-12^{\circ}\text{C}$ . De acordo com Hazelwood e McLean<sup>4</sup>, a temperatura ideal de armazenamento para a carne congelada é de  $-18^{\circ}\text{C}$  havendo tolerância de até  $-12^{\circ}\text{C}$  durante um curto espaço de tempo.

Neste trabalho objetivou-se enumerar bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM) em hambúrgueres comercializados no comércio formal do município de Niterói-RJ; identificar as temperaturas medidas dos balcões frigoríficos de exposição e também as temperaturas dos hambúrgueres crus expostos nestes balcões; e determinar o coeficiente de correlação dos resultados encontrados.

## **METODOLOGIA**

### **Local e área do estudo**

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), onde foram analisadas as amostras de hambúrgueres de carne bovina e de hambúrgueres misto (carne bovina e carne de frango) que eram comercializados embalados individualmente em cartuchos de polipropileno duplos ou simples, com peso individual variando de 56 g a 120 g, coletadas no comércio formal (supermercados e/ou açougues) do município de Niterói-RJ, no período de maio a dezembro de 2011. Sendo assim, um conjunto de quatro hambúrgueres foi considerado uma unidade de amostra.

### **Colheitas de amostras**

Foram coletadas 80 amostras de hambúrgueres, sendo 40 de carne bovina e 40 mistos (carne bovina e carne de frango). Os hambúrgueres comercializados em supermercados e/ou açougues do município de Niterói-RJ, foram adquiridos através de compra direta nos estabelecimentos comerciais, sendo a escolha do produto realizada de forma aleatória. As amostras foram coletadas na própria embalagem original sendo armazenadas individualmente em sacos de polietileno de baixa densidade com fecho hermético, mantidas em recipiente isotérmico portátil, com gelo, até a chegada ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), onde foram realizadas as análises laboratoriais.

### **Diluições seriais decimais**

De cada amostra, utilizando-se balança digital de precisão, foi retirada uma alíquota de 25 g, com o auxílio de espátula de aço inoxidável esterilizada, e colocada em saco para homogeneização e depois adicionado 225 mL de Água Peptonada (AP) sendo, em seguida, homogeneizada por 60 segundos no “Stomacher” em velocidade normal, obtendo assim a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, após homogeneização, com auxílio de uma micropipeta transferiu-se 1,0 mL desta solução  $10^{-1}$  para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de AP, obtendo assim a diluição  $10^{-2}$  e a partir desta diluição utilizando-se o mesmo procedimento, obteve-se a diluição de  $10^{-3}$ . Estas diluições foram usadas para a contagem padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas, conforme a descrição a seguir.

### **Método de contagem padrão de aeróbios e mesófilos em placas**

A partir das diluições de Água Peptonada (AP) transferiram-se alíquotas de 1,0 mL em uma placa de Petri para cada diluição ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ), respectivamente, onde verteu-se de 15 a 20 mL do meio Ágar Padrão para Contagem (APC) – método de semeadura em profundidade (“pour plate”). Após a homogeneização, e solidificação do meio, as placas foram incubadas, em posição invertida, em estufa com temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 horas para a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos<sup>16</sup>,  
17.

O método de contagem em placas é a técnica mais utilizada na determinação do tamanho de uma população bacteriana. Na aplicação deste método são considerados três princípios: cada colônia é originada do crescimento e da multiplicação de uma bactéria; o inóculo original é sempre homogêneo; e não existe agregação das células. Na realização do método de contagem em placa é essencial que somente um número limitado de colônias cresça em cada placa. No método “pour plate” o inóculo é

realizado com um volume de 1,0 mL da diluição bacteriana diretamente na placa de Petri. O meio nutriente deve ser mantido em banho-maria entre 45°C e 50°C para impedir a solidificação do Ágar, para que seja vertido sobre a amostra, que será homogeneizada através de agitação suave da placa. Após a solidificação do Ágar a placa é incubada na temperatura de crescimento da bactéria. Esta metodologia permite o crescimento das colônias dentro do Ágar Padrão para Contagem (APC)<sup>20</sup>.

Madigan et al<sup>8</sup>, descreveram que nas técnicas de semeadura em profundidade (“pour plate”), é importante que o número das colônias desenvolvidas nas placas não seja muito grande, porque, em placas muito populosas, algumas células podem não formar colônias ou estas podem fundir-se, levando a erros de contagem. Também é essencial que o número de colônias não seja muito pequeno, pois poderá comprometer a significância estatística da contagem. Normalmente, na prática, são contadas apenas placas que possuam entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC).

### **Temperaturas dos balcões de exposição e dos hambúrgueres**

Durante a aquisição dos hambúrgueres, no comércio formal, foi mensurada a temperatura dos balcões frigoríficos de exposição e a temperatura dos hambúrgueres adquiridos no momento da compra, utilizando um termômetro digital com laser infravermelho (Suryha<sup>®</sup>).

### **Coefficiente de correlação de Pearson**

Nesse estudo também utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) para verificar o grau de dependência entre os valores encontrados nas amostras analisadas.

Segundo Berquó et al<sup>1</sup>, em pesquisas que envolvem a consideração de duas ou mais variáveis, estas são estudadas simultaneamente, procurando-se uma possível

correlação entre elas, isto é, quer-se saber se as alterações sofridas por uma das variáveis são acompanhadas por alterações nas outras. No caso particular de duas variáveis X e Y, procura-se verificar se os aumentos (ou diminuições) em X, correspondem a aumentos (ou diminuições) em Y, ou se aumentos (ou diminuições) em X são acompanhados de diminuições (ou aumentos) em Y ou, finalmente, se os aumentos (ou diminuições) em X não estão relacionados com as alterações em Y.

Deve-se acentuar que o valor de  $r$ , calculado em qualquer caso, mede o grau de relação correspondente ao tipo de equação que é realmente admitida. Assim, se for adotada uma equação linear, e se as expressões conduzirem a um valor de  $r$  próximo de zero, isso significa que quase não há correlação linear entre as variáveis. Entretanto, não significa que não há nenhuma correlação, porque pode realmente existir uma forte correlação não-linear entre as variáveis. Em outras palavras, o coeficiente de correlação mede a excelência do ajustamento aos dados da equação realmente considerada. A menos que haja especificação em contrário, o termo coeficiente de correlação será usado para indicar o de correlação linear<sup>18</sup>.

Também foi determinado o valor da correlação (coeficiente) de determinação ( $R^2$ ), que é calculado elevando-se ao quadrado o valor de  $r$  encontrado. A correlação de determinação indica a porcentagem de variação dos valores de Y em função do valor de X.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados da CBHAM variaram de  $3,8 \times 10^3$  UFC/g até  $6,5 \times 10^6$  UFC/g, com uma média calculada de  $1,8 \times 10^5$  UFC/g. Dos 80 hambúrgueres analisados, 43 (53,75%) tiveram contagem acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g (**TABELA 1**) (**FIGURA 1**), indicando uma baixa qualidade higienicossanitária destes produtos. Dos 40 hambúrgueres de carne bovina, 25 (62,5%) apresentaram contagem acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g e dos 40

hambúrgueres mistos, 18 (45,0%) estavam comprometidos. Na legislação brasileira não consta limites de tolerância para CBHAM, contagem de coliformes a 35°C e contagem total de fungos filamentosos e leveduras para hambúrgueres. Porém, tem sido observado que a CBHAM acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g em carne moída fresca compromete o produto em relação à sua qualidade higienicossanitária<sup>10, 16</sup>.

Tavares e Serafini<sup>19</sup> verificaram a qualidade de hambúrgueres de carne bovina na cidade de Goiânia, encontrando resultados diferentes a este estudo, que variaram entre a faixa de  $10^1$  e  $10^4$  UFC/g. Todos inferiores ao valor de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g encontrando-se em condições microbiológicas satisfatórias. Porém, estas análises foram realizadas em hambúrgueres prontos para o consumo, conseqüentemente a cocção do produto pode ter tido um efeito de decréscimo do número de BHAM nestes hambúrgueres.

Também Carvalho et al<sup>2</sup>, ao analisarem cinco amostras de hambúrgueres de frango, não encontrou nenhum com CBHAM acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g, sendo que o valor mínimo encontrado foi de  $2,3 \times 10^3$  UFC/g e o valor máximo de  $2,5 \times 10^4$  UFC/g, resultado que caracteriza estes produtos com condições apropriadas para o consumo. Porém, Mota et al<sup>11</sup> analisaram 15 amostras de sanduíches (pão, hambúrguer, queijo, alface e tomate) comercializados em três redes de “fast-food” e observaram que a CBHAM em quatro (26,67%) amostras. A contagem total dos produtos variou de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g a  $6,4 \times 10^5$  UFC/g.

Em trabalho realizado por Parra et al<sup>13</sup> que analisaram 27 amostras de três diferentes marcas de hambúrgueres (duas de carne bovina e uma de frango), a CBHAM apresentou-se muito mais elevada do que o presente estudo. A média foi de  $1,0 \times 10^{16}$  UFC/g e  $2,2 \times 10^{15}$  UFC/g nos hambúrgueres bovinos e uma média de  $1,7 \times 10^{13}$  UFC/g nos hambúrgueres de frango.

Ratificando a importância do processamento higienicossanitário industrial adequado, pode-se observar, de forma positiva, o trabalho realizado por Leal et al<sup>7</sup> que analisaram 60 amostras de hambúrgueres de frango, sendo 30 artesanais e 30 industriais, cujo resultados apresentaram alta CBHAM nos produtos artesanais (média de  $2,1 \times 10^7$  UFC/g), enquanto que os hambúrgueres industriais apresentaram uma média de  $3,5 \times 10^1$  UFC/g.

Dos 80 balcões frigoríficos que tiveram suas temperaturas verificadas apenas 10 (12,5%) se encontravam com temperaturas abaixo de  $-12^\circ\text{C}$  (**TABELA 1**), sendo que a menor temperatura verificada foi de  $-19,7^\circ\text{C}$  e a maior foi de  $19,8^\circ\text{C}$ ., uma variação de  $39,5^\circ\text{C}$  (**FIGURA 1**).

Corroborando para estes resultados, Prado et al<sup>14</sup> avaliaram as temperaturas de armazenamento de 87 balcões frigoríficos observando valores entre  $6,7^\circ\text{C}$  e  $9,7^\circ\text{C}$  em 35% destes equipamentos além de 12% que se encontravam com temperaturas entre  $9,8^\circ\text{C}$  e  $12,8^\circ\text{C}$ , temperaturas altas que comprometem a qualidade da carne aumentando o risco de ocorrência de um crescimento bacteriano indesejável.

Em outra pesquisa, realizada por Mendes et al<sup>9</sup>, sobre as condições de comercialização de carne em supermercados em Salvador-BA, constatou-se o mau funcionamento dos equipamentos refrigerados assim como a falta de controle adequado das temperaturas de conservação, colocando em risco a qualidade dos produtos e a sua utilização.

Das 80 amostras de hambúrgueres que tiveram as temperaturas verificadas durante sua aquisição, nenhuma se apresentou com temperatura igual ou inferior a  $-12^\circ\text{C}$  (**TABELA 1**), tal como indicado no próprio rótulo destes produtos. A menor temperatura observada nos hambúrgueres foi de  $-8,7^\circ\text{C}$  e a maior temperatura foi de  $19,2^\circ\text{C}$ , uma variação de  $27,9^\circ\text{C}$  (**FIGURA 1**), temperaturas favoráveis à multiplicação

de microrganismos patogênicos no alimento, aumentando o risco do consumidor de adquirir uma toxinfecção alimentar.

O binômio temperatura e tempo pode ser compreendido melhor verificando-se o trabalho feito por Izquierdo et al<sup>5</sup> que avaliaram 56 amostras de hambúrgueres que foram armazenados a temperaturas de -10°C; 4°C e 10°C, durante 96 horas. As CBHAM de cada temperatura foram realizadas nos tempos 0 h (menos de seis horas); 48 h e 96 h. As maiores CBHAM ocorreram nos produtos armazenados a 10°C por 96 h ( $6,8 \times 10^5$  UFC/g e  $7,2 \times 10^6$  UFC/g), enquanto que os menores valores se encontraram no tempo 0 h ( $8,1 \times 10^4$  e  $1,1 \times 10^5$  UFC/g). Este trabalho corrobora no que diz respeito a importância do armazenamento dos produtos cárneos em temperaturas de congelamento a -12°C evitando assim o aumento significativo de BHAM nestes alimentos.

Também Ramírez et al<sup>15</sup> analisaram 81 amostras de hambúrgueres de carne bovina armazenados a temperaturas de -15°C; 5°C e 15°C nos diferentes tempos de 0 h; 48 h e 96 h, considerando o tempo que transcorre desde a elaboração destas carnes até o consumo. As médias das CBHAM variaram entre  $1,1 \times 10^6$  UFC/g na temperatura de -15°C;  $8,7 \times 10^5$  UFC/g a 5°C e  $1,1 \times 10^6$  UFC/g a 15°C. Em relação ao tempo de armazenamento as médias encontradas foram de  $2,1 \times 10^6$  UFC/g no tempo 0 h;  $1,1 \times 10^6$  UFC/g em 48 h e  $4,8 \times 10^5$  no tempo 96 h. Todos os resultados acima dos limites máximos ( $1,0 \times 10^5$  UFC/g).

Ao utilizar o coeficiente de correlação ( $r$ ) para verificar o grau de dependência entre os valores encontrados nas amostras analisadas dos hambúrgueres, entre temperatura dos balcões frigoríficos, temperatura dos hambúrgueres e BAHM, verificou-se que todas as variáveis apresentaram correlação linear positiva. Houve uma correlação linear positiva significativa ( $r=0,7867$ ) (**FIGURA 2**) entre as variáveis temperatura dos balcões frigoríficos e temperatura dos hambúrgueres.



Não houve uma correlação significativa entre as variáveis temperatura dos balcões frigoríficos e BHAM ( $r=0,2101$ ) (**FIGURA 3**) e entre as variáveis temperatura dos hambúrgueres e BHAM ( $r=0,1954$ ) (**FIGURA 4**), concluindo-se que não há apenas um fator específico que determine as condições higienicossanitárias dos hambúrgueres, mas sim um conjunto de fatores, tais como os relacionados à microbiota do produto cárneo, tempo de exposição, ingredientes, marca e forma de processamento.

## CONCLUSÃO

A comercialização de hambúrgueres em açougues e/ou supermercados está sendo procedida de forma equivocada pelos comerciantes, pois estes, em sua maioria, comercializam os hambúrgueres em balcões frigoríficos que não atingem a temperatura ideal de armazenamento do produto, indicada no rótulo pelos próprios fabricantes, que é de no máximo  $-12^{\circ}\text{C}$ . Sendo assim, estes produtos atingem temperaturas ótimas para a multiplicação de microrganismos da microbiota já existente na carne, aumentando o risco do consumidor adquirir uma toxinfecção alimentar.

Torna-se necessário que as indústrias adotem padrões adequados e melhor controle no processamento dos seus produtos cárneos, afim de diminuir a carga microbiana destes produtos. Além de criarem um monitoramento às práticas adequadas de armazenamento e exibição dos hambúrgueres no comércio formal.

Recomenda-se, também, reforçar o sistema de vigilância sanitária e estabelecer maior controle microbiológico na produção dos hambúrgueres tanto nas indústrias, mas principalmente, quanto na forma de exposição deste produto no comércio formal, visando melhorar a qualidade higienicossanitária do produto e, conseqüentemente, proteger a saúde dos consumidores.

## REFERÊNCIAS

1. BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. 2. ed. São Paulo: EPU. 1981, 350 p.
2. CARVALHO, A. C. F. B. et al. Presença de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arq. Inst. Biol.** v. 72, n. 3, p. 303-307, 2005.
3. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu. 2008, 182 p.
4. HAZELWOOD, D.; McLEAN, A. C. **Manual de Higiene Para Manipuladores de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela. 1994, 140 p.
5. IZQUIERDO, P. et al. Aminas biógenas y crecimiento bacteriano en carne de hamburguesas. **Rev. Cient. FCV-LUZ**. v. XIV, n. 1, p. 7-12, 2004.
6. JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2005, 711 p.
7. LEAL, K. V. et al. Comparación de la calidad microbiológica de hamburguesa de pollo elaborada en forma artesanal e industrial. **Rev. Cient. FCV-LUZ**. v. XVIII, n. 5, p. 624-630, 2008.
8. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Pearson Makron Books. 2004, 608 p.
9. MENDES, A. C. R. et al. Condições de comercialização de cortes cárneos em supermercados da cidade de Salvador, BA. **Rev. Hig. Aliment.** v. 15, n. 83, p. 58-62, 2001.
10. MORTON, R. D. Aerobic plate count. Cap. 7, p. 63-67. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association (APHA). 2001.
11. MOTA, J. et al. Análise microbiológica de sanduíches comercializados em estabelecimentos fast-food no município de Vila Velha, ES. **Rev. Hig. Aliment.** v. 23, n. 170/171 (encarte), p. 341-342, 2009.
12. NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. Hambúrguer: evolução comercial e padrões microbiológicos. **Bol. CEPPA**. v. 23, n. 1, p. 59-74, 2005.
13. PARRA, K. et al. Evaluation of microbial and physical-chemistry of frozen hamburger patties expended in Maracaibo, Zulia State, Venezuela. **Rev. Cient. FCV-LUZ**. v. XII, n. 6, p. 715-720, 2002.
14. PRADO, F. F.; VALENTE, D.; OLIVEIRA, C. A. D. Descrição de temperaturas de produtos cárneos, em açougues do município de Ribeirão Preto, SP. **Rev. Hig. Aliment.** v. 23, n. 174/175, p. 32-35, 2009.
15. RAMÍREZ, A. F. et al. Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento sobre la calidad microbiológica de carne de hamburguesa. **Rev. Cient. FCV-LUZ**. v. XVI, n. 4, p. 428-437, 2006.

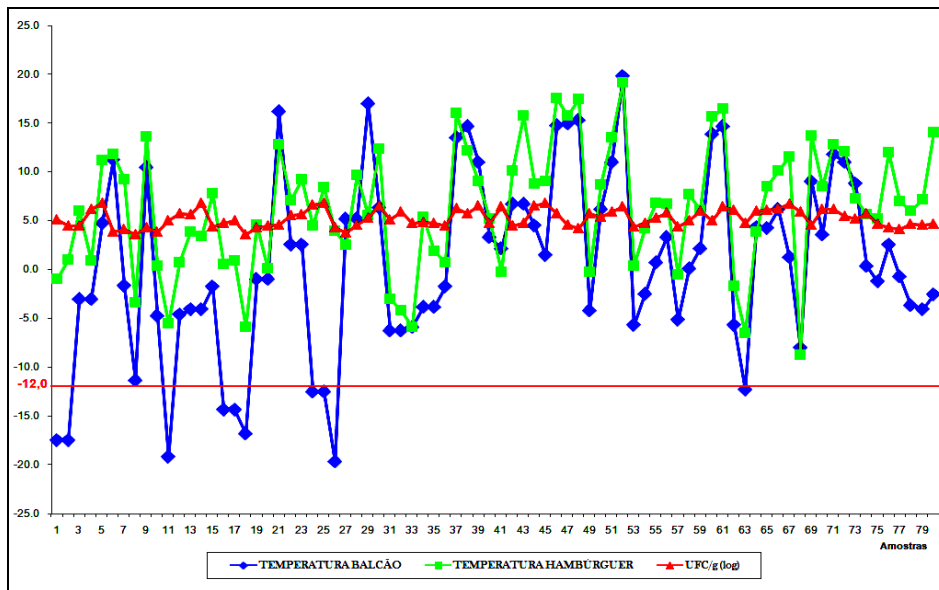
16. SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela. 2007, 536 p.
17. SIQUEIRA, R. S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Brasília: EMBRAPA. 1995, 159 p.
18. SPIEGEL, M. R. **Estatística**. 3. ed. São Paulo: Makron Books. 1993, 643 p.
19. TAVARES, T. M.; SERAFINI, A. B. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo *trailers* em Goiânia (GO). **Rev. Patol. Trop.** v. 32, n. 1, p. 45-52, 2003.
20. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed. 2012, 934 p.

**TABELA 1** Número de amostras que se encontravam fora dos padrões em relação a contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas e temperaturas dos balcões e dos hambúrgueres, com suas respectivas médias e desvios padrões (DP).

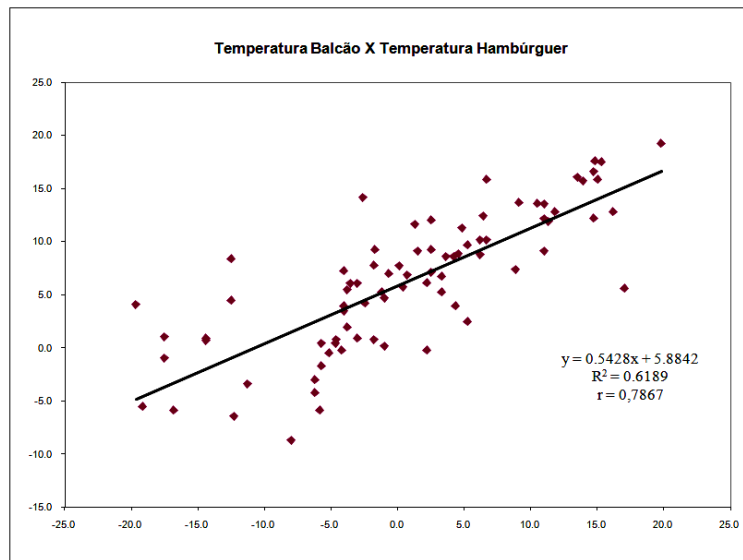
ANÁLISES	Média $\pm$ DP	Padrão N (%)	Fora do Padrão N (%)	TOTAL
Temperatura dos Balcões Frigoríficos	0,720 $\pm$ 9,2913	10 (12,5%)	70 (87,5%)	80
Temperatura dos Hambúrgueres	6,275 $\pm$ 6,4110	--- (0%)	80 (100%)	80
Contagem Padrão Aeróbios Mesófilos	5,261* $\pm$ 0,8891	37 (46,25%)	43 (53,75%)	80

\* UFC/g (log)

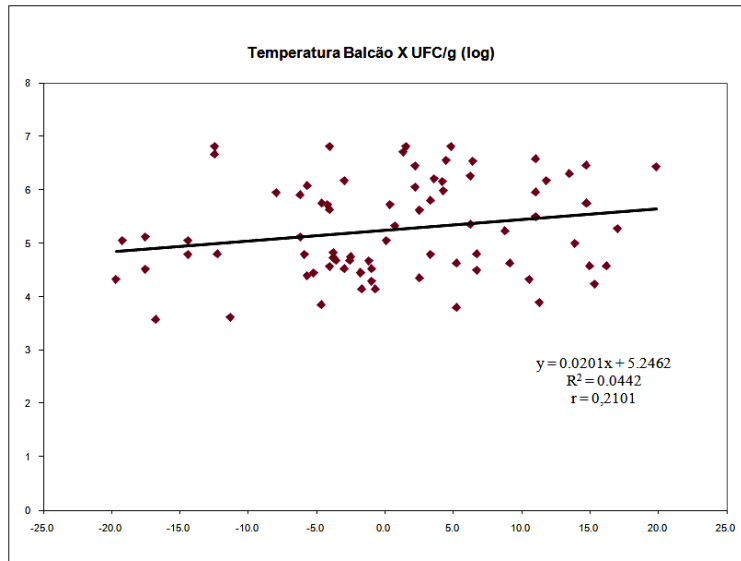
**FIGURA 1** Temperaturas dos balcões frigoríficos, temperaturas dos hambúrgueres e enumeração das bactérias aeróbias mesófilas (log UFC/g).



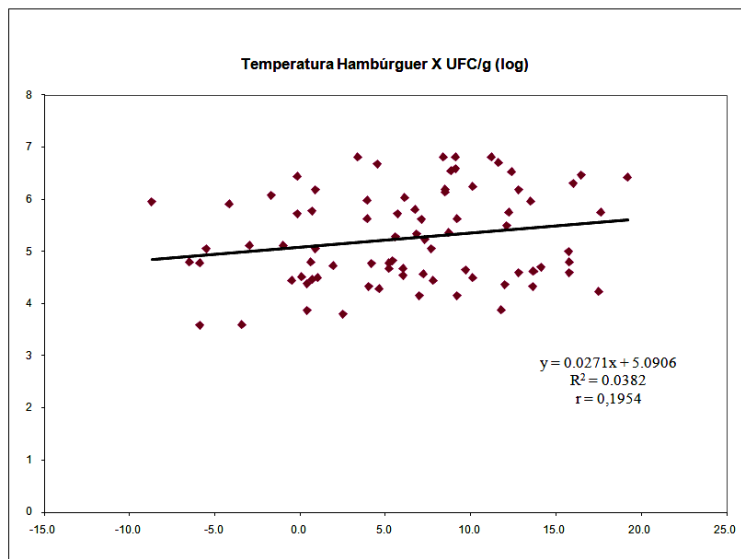
**FIGURA 2** Correlação entre as temperaturas dos hambúrgueres e as temperaturas dos balcões frigoríficos.



**FIGURA 3** Correlação entre o número de bactérias heterotróficas aeróbios mesófilas e as temperaturas dos balcões frigoríficos.



**FIGURA 4** Correlação entre o número de bactérias heterotróficas aeróbios mesófilas e as temperaturas dos hambúrgueres.



# Correlação entre contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus\*

## Correlation between aerobic mesophilic heterotrophic bacterial count and isolation of *Salmonella* spp. in raw hamburgers

Jorge Luiz Fortuna, \*\* Elmiro Rosendo do Nascimento, \*\*\* Robson Maia Franco\*\*\*

### Resumo

Objetivou-se correlacionar a Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e o isolamento de *Salmonella* spp. em hambúrgueres. Foram coletadas e analisadas 80 amostras de hambúrgueres. Realizou-se a contagem total de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas através do método de semeadura em profundidade (*pour plate*) e isolamento de *Salmonella* spp. através de microbiologia convencional. Também se utilizou o coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) para verificar o grau de dependência entre os valores encontrados nas amostras analisadas. Não houve correlação significativa em relação à contaminação dos hambúrgueres pela *Salmonella* spp. e as altas contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas.

**Palavras-chave:** bactérias aeróbias mesófilas; *Salmonella*; hambúrguer; correlação.

### Abstract

The objective was to correlate the aerobic mesophilic heterotrophic bacterial count and isolation of *Salmonella* spp. in hamburgers. There were collected and analyzed 80 samples of hamburgers. It was carried out the total of aerobic mesophilic heterotrophic bacterial count bacteria by pour plate and isolation of *Salmonella* spp. by standard microbiology. Further, the Spearman correlation coefficient was used to verify the degree of dependence between the values found in the samples analyzed. There was no significant correlation of hamburgers contamination by *Salmonella* spp. and high counts of aerobic mesophilic heterotrophic bacterial.

**Keywords:** Aerobic Mesophilic; bacteria; *Salmonella*; hamburger; correlation.

### Introdução

O hambúrguer é um alimento muito apreciado, principalmente pela praticidade do seu preparo e por ser um alimento com ótimas características sensoriais. Contudo, há uma grande possibilidade de haver algum tipo de contaminação da sua principal matéria-prima, a carne, desde o abate (carcaça), manipulação, armazenamento, até o seu preparo e consumo.

O hambúrguer é um produto cárneo industrializado, obtido da carne moída de animais de açougue, com adição ou não de tecido adiposo e outros ingredientes (Brasil, 2000). Sendo um produto submetido a um processo de manipulação excessiva com problemático sistema de conservação, favorecendo sua contaminação por patógenos. Conseqüentemente, torna-se necessária a avaliação de sua qualidade higiênico-sanitária do ponto de vista microbiológico a fim de garantir que o consumo ocorra de forma segura e livre de contaminação.

A contagem padrão em placas de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) indica a qualidade higiênico-

sanitária dos alimentos. Silva et al. (2007) descreveram que, ao usar esta técnica, não se diferenciam os tipos de bactérias, sendo utilizadas para a obtenção de informações sobre a qualidade de produtos, práticas de fabricação, qualidade das matérias-primas utilizadas, condições de processamento, qualidade de manipulação e validade comercial do produto, tornando-se útil na avaliação da qualidade do produto, pois populações altas de bactérias podem estar relacionadas com as deficiências e/ou falha na sanitização, no controle do processo ou na qualidade dos ingredientes.

Não há legislação em relação ao padrão microbiológico para CBHAM em hambúrgueres. Porém, Silva et al. (2007) e Morton (2001) descreveram que o número máximo dessa microbiota, em carne moída crua, não deve ultrapassar  $1,0 \times 10^5$  UFC/g.

O gênero *Salmonella* representa um dos mais importantes grupos de bactérias patogênicas presentes nos alimentos, principalmente os de origem animal, e um dos principais responsáveis por causar infecções alimentares. Além disso, os surtos de doenças alimentares constituem um desafio

\* Recebido em 20 de setembro de 2012 e aceito em 23 de fevereiro de 2013.

\*\* Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Laboratório de Microbiologia. Campus X. Curso de Ciências Biológicas. Av. Kaikan, s/n – Universitário. Teixeira de Freitas-BA. CEP 45995-300. Brasil. Tel: 55(73)32638071. Fax: 55(73)32638054; e-mail: jfortuna@uneb.br. Programa de Pós-Graduação (Doutorado) de Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal Fluminense (UFF).

\*\*\* Universidade Federal Fluminense (UFF). Faculdade de Veterinária. Niterói-RJ. Brasil. Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

às indústrias alimentícias e aos órgãos de saúde, sendo o hambúrguer, tanto de carne bovina quanto o misto (carne bovina e de frango), um dos alimentos mais frequentemente relacionados a estes surtos. Essas infecções alimentares, relacionadas com este produto, principalmente causadas por *Salmonella* spp., são denominadas salmoneloses.

*Salmonella* spp. são bactérias patogênicas importantes para a indústria alimentar, sendo um dos micro-organismos significativos causadores de infecção alimentar (Siqueira et al., 2003), além de ser uma das principais bactérias veiculadas por alimentos responsável pela ocorrência de doenças que ocasionam perdas econômicas em todo o mundo (Giombelli e Silva, 2002). São micro-organismos que invadem a membrana mucosa do trato intestinal, e são transmitidos de forma fecal-oral aos seres humanos principalmente através da água, da carne, dos ovos e dos produtos das aves domésticas contaminados. A infecção por *Salmonella* spp. é uma doença gastrointestinal, sendo mais frequentemente transmitida dos outros animais aos seres humanos (D'Aoust, 1991; Ferretti et al., 2001; Kwang et al., 1996; Riyaz-UI-Hassan et al., 2004). Van Pouke (1990) afirmou que a infecção por *Salmonella* spp. é resultado da ingestão do alimento ou da água contendo números suficientes destas bactérias que alcançam e invadem o intestino delgado, sendo que os principais sintomas clínicos incluem a gastroenterite aguda, bacteremia, com ou sem infecção extraintestinal, febre, e até um estado assintomático do portador.

Os limites de tolerância máxima e padrões microbiológicos para hambúrgueres são estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2001), sendo que para amostra indicativa ou amostra representativa, o alimento deve estar totalmente ausente de células bacterianas de *Salmonella* spp.

Neste trabalho objetivou-se correlacionar a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM) e o isolamento de *Salmonella* spp. em hambúrgueres comercializados no comércio formal do município de Niterói-RJ.

## Material e método

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), onde foram analisadas 80 amostras de hambúrgueres, sendo 40 de carne bovina e 40 de hambúrgueres misto (carne bovina e carne de frango) que eram comercializados embalados individualmente em cartuchos de polipropileno duplos ou simples, com peso individual variando de 56g a 120g, coletadas no comércio formal (supermercados e/ou açougues) do município de Niterói-RJ, no período de maio a dezembro de 2011. Sendo assim, um conjunto de quatro hambúrgueres foi considerado uma unidade amostral. Os hambúrgueres foram adquiridos através de compra direta nos estabelecimentos comerciais, sendo a escolha do produto realizada de forma aleatória. As amostras foram coletadas na própria embalagem original, sendo armazenadas individualmente em sacos de polietileno de baixa densidade com fecho hermético, mantidas em recipiente isotérmico portátil, com gelo, até a chegada ao laboratório onde foram realizadas as análises.

A partir das diluições de Água Peptonada (AP) transferiram-se alíquotas de 1,0 mL em uma placa de Petri para cada diluição ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ), respectivamente, onde verteu-se de

15 a 20 mL do meio Ágar Padrão para Contagem (APC) – método de semeadura em profundidade (“pour plate”). Após a homogeneização, e solidificação do meio, as placas foram incubadas, em posição invertida, em estufa com temperatura de 35°C/24-48 horas para a contagem total de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (Silva et al., 2007; Morton, 2001; Siqueira, 1995).

O método empregado para a análise microbiológica de isolamento e identificação de *Salmonella* spp. foi baseado na Instrução Normativa (IN) n° 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), que oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal (Brasil, 2003).

Para a etapa do pré-enriquecimento foi pesada, em balança digital de precisão, e em saco para homogeneização, 25g da amostra na qual foram adicionados 225 mL de Solução Salina Peptonada Tamponada 1% (SSPT). Após, foi homogeneizado por 60 segundos no “Stomacher” em velocidade normal. Fechou-se hermeticamente o saco contendo a amostra e a SSPT e deixou-se em repouso por uma hora em temperatura ambiente antes de ser colocado em estufa à temperatura de 36°C/16-20 horas.

Na fase do enriquecimento, a partir do procedimento do pré-enriquecimento, foram inoculados, simultaneamente para cada amostra, nos meios líquidos seletivos, Caldo Selenito Cistina (SC) e Caldo Tetracionato (TT). Foram transferidas assepticamente alíquotas de 1,0 mL para tubo contendo 10,0 mL de Caldo SC e 1,0 mL para tubo contendo 10,0 mL de Caldo TT. Todos foram incubados em banho-maria a 41°C/24-30 horas.

O plaqueamento seletivo ocorreu a partir dos caldos seletivos de enriquecimento, onde repicou-se sobre a superfície previamente seca de placas de Petri com cada meio sólido seletivo de escolha, estriando de forma a se obter UFC isoladas com o auxílio de alça bacteriológica. Foram obtidas duas placas para cada meio de cultura de escolha, uma originária do Caldo SC e outra do Caldo TT. Os meios sólidos escolhidos foram: Ágar Hektoen (HE); Ágar *Salmonella-Shigella* (SS); Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar *Salmonella* Diferencial (ASD). Todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C/18-24 horas.

Na fase da triagem, aqui denominada de triagem primária, foram escolhidas até três UFC típicas de cada placa de Petri do plaqueamento seletivo, que foram repicadas para dois diferentes tubos contendo, respectivamente, Ágar Três Açúcares Ferro (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA), que foram incubados em estufa bacteriológica a 36°C/24-30 horas. Após o tempo de incubação, foram escolhidos os respectivos pares dos tubos de TSI e LIA com leituras fenotípicas características para o gênero *Salmonella*, com ou sem produção de H<sub>2</sub>S. Tubos TSI/LIA típicos apresentavam-se com as seguintes características: TSI com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho) e LIA com fundo e bisel alcalino (púrpura). Tubos TSI/LIA atípicos 1: TSI com fundo e bisel ácido (amarelo) e LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura). Tubos TSI/LIA atípicos 2: TSI com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho) e LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura). Os tubos TSI/LIA que foram descartados apresentavam as seguintes características: TSI com fundo e bisel ácido (amarelo) e LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura).

A partir dos tubos utilizados na triagem primária (TSI e LIA), com leituras do meio de cultura típico, atípico 1 e atípico 2 para *Salmonella* spp., iniciou-se a triagem secundária (provas bioquímicas complementares). Foram repicados, utilizando a agulha bacteriológica, transferindo colônias para tubos contendo meios de cultura que evidenciaram as propriedades fisiológicas e metabólicas das culturas suspeitas por meio da verificação da produção da Urease (Caldo Ureia) e desaminação da Fenilalanina (Ágar Fenilalanina). Esta fase tornou-se importante para que se diferenciasses células bacterianas de *Proteus* spp., que são Urease positiva (hidrolisam a Ureia) e desaminam a Fenilalanina, de células bacterianas de *Salmonella* spp.

Para o teste da produção da Urease semeou-se maciçamente colônias em tubos de ensaio contendo 3,0 mL de Caldo Ureia e incubou-se a 36°C/24-30 horas. Foi observada a coloração do meio. A manutenção da cor inicial do meio indicou que não ocorreu hidrólise da ureia. A alteração para rosa foi indicativa de alcalinização do meio devido à ação da urease sobre a Ureia. A *Salmonella* spp. não produz a Urease. No teste da desaminação da Fenilalanina inoculou-se a superfície do bisel do Ágar Fenilalanina por estriamento e incubou-se a 36°C/18-24 horas. Para a leitura, foram adicionadas duas a três gotas de solução de Cloreto Férrico a 10%. A alteração de coloração da cultura na superfície do bisel para verde indicou reação de desaminação da Fenilalanina. *Salmonella* spp. não desamina a Fenilalanina.

A partir dos resultados negativos do teste da produção da Urease e da desaminação da Fenilalanina, característicos de células bacterianas de *Salmonella* spp., foram repicadas colônias dos tubos de TSI correspondentes para Ágar Nutriente inclinado e incubadas a 36°C/18-24 horas, para a prova de sorologia (sorologia). Após a incubação, a partir destes cultivos em Ágar Nutriente inclinado, ressuspendeu-se o cultivo obtido em aproximadamente 2,0 mL de Solução Salina 0,85%. Em lâmina de vidro foram depositadas separadamente uma gota de Solução Salina 2% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente O, diretamente do frasco. Em seguida, acrescentou-se a cada uma delas uma gota da suspensão teste. Com movimentos circulares, realizou-se a leitura com iluminação sobre o fundo escuro em um a dois minutos, classificando a reação do seguinte modo: positiva (presença de aglutinação somente na mistura cultivo mais antissor); negativa (ausência de aglutinação em ambas as misturas); e não específica (presença de aglutinação em ambas as misturas).

Além disso, em cada etapa das análises microbiológicas foram transferidas alíquota da alça de platina dos caldos, além das colônias das placas e tubos, para uma lâmina de vidro para a realização de esfregaço corado pelo método de Gram (características morfotintórias), para a observação de bastonetes Gram-negativos, utilizando-se um microscópio óptico com objetiva de imersão.

Neste estudo utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) para verificar o grau de dependência entre os valores encontrados nas amostras analisadas. A incidência de contaminação por *Salmonella* spp. em relação à CBHAM nos hambúrgueres crus analisados foi calculada através da regressão logística simples. Para os cálculos estatísticos utilizou-se o programa estatístico *BioStat 3.0*, versão 2003.

Segundo Ayres et al. (2003), o coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) é uma prova não paramétrica com a finalidade de determinar o grau de associação entre duas variáveis, pelo

menos, em nível ordinal e dispostas em postos ordenados em duas séries X e Y. A regressão logística simples testa uma variável dependente de Y e uma variável independente, sendo a variável Y binária, ou seja, assume valores 1 (positivo) e valores 0 (negativo).

## Resultados e discussão

Os resultados da CBHAM variaram de  $3,8 \times 10^3$  UFC/g até  $6,5 \times 10^6$  UFC/g, com uma média calculada de  $1,8 \times 10^5$  UFC/g. Dos 80 hambúrgueres analisados, 43 (53,75%) tiveram contagem acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g, indicando uma baixa qualidade higiênico-sanitária destes produtos. Dos 40 hambúrgueres de carne bovina, 25 (62,5%) apresentaram contagem acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g e dos 40 hambúrgueres mistos, 18 (45,0%) estavam comprometidos. Na legislação brasileira não consta limites de tolerância para CBHAM, contagem de coliformes a 35°C e contagem total de fungos filamentosos e leveduras para hambúrgueres. Porém, tem sido observado que a CBHAM acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g em carne moída fresca compromete o produto em relação à sua qualidade higiênico-sanitária (Morton, 2001; Silva et al., 2007).

Das 80 amostras de hambúrgueres analisadas, 22 (27,5%) estavam contaminadas por *Salmonella* spp., sendo que destas, oito (36,36%) também apresentavam alta contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM) e 14 (63,64%) com contagem abaixo do ideal. Verificando-se os resultados das análises da CBHAM, constatou-se que das 43 (53,75%) amostras acima do limite ideal, oito (18,6%) também estavam contaminadas por *Salmonella* spp., enquanto 35 (81,4%) encontravam-se livres da contaminação por tal bactéria (Tabela 1).

**Tabela 1:** Correlação entre os resultados encontrados na contagem padrão de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de *Salmonella* spp. nos hambúrgueres crus analisados

Resultados das Amostras	CBHAM > $1,0 \times 10^5$ UFC/g	CBHAM $\leq 1,0 \times 10^5$ UFC/g	TOTAL
<i>Salmonella</i> spp. +	8	14	<b>22 (27,5%)</b>
<i>Salmonella</i> spp. -	35	23	<b>58 (72,5%)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>43 (53,75%)</b>	<b>37 (46,25%)</b>	<b>80 (100%)</b>

CBHAM: Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas

Em pesquisa realizada com um total de 27 amostras de hambúrgueres vendidos na cidade de Maracaibo, Venezuela por Parra et al. (2002), sendo 18 de carne bovina e nove de carne de frango, nove (33,33%) hambúrgueres de carne bovina encontravam-se contaminados por *Salmonella* spp., enquanto a CBHAM apresentou-se muito mais elevada do que o presente estudo, com a média de  $1,0 \times 10^{16}$  UFC/g e  $2,2 \times 10^{15}$  UFC/g nos hambúrgueres bovinos e de  $1,7 \times 10^{13}$  UFC/g nos hambúrgueres de frango.

Ratificando a importância do processamento higiênico-sanitário industrial adequado, pode-se observar a relevância do trabalho realizado por Leal et al. (2008), que analisaram 60 amostras de hambúrgueres de frango, sendo 30 artesanais e 30 industriais, cujo resultados apresentaram alta CBHAM nos



produtos artesanais (média de  $2,1 \times 10^7$  UFC/g), enquanto os hambúrgueres industriais apresentaram uma média de  $3,5 \times 10^1$  UFC/g. Nesta mesma pesquisa isolou-se *Salmonella* spp. em um (1,66%) hambúrguer, sendo este elaborado de forma artesanal.

Em trabalho experimental realizado por Ramírez et al. (2006), onde foram analisadas 81 amostras de hambúrgueres, armazenados em diferentes temperaturas ( $-15^\circ\text{C}$ ;  $5^\circ\text{C}$  e  $15^\circ\text{C}$ ) e intervalos de tempo (0 h; 48 h e 96 h), somente uma (1,23%) apresentou contaminação por *Salmonella* spp. A amostra contaminada havia sido armazenada a  $15^\circ\text{C}$  por 96 horas, mostrando que este resultado provavelmente se deve ao binômio temperatura-tempo, permitindo que a *Salmonella* spp. possa se multiplicar, caso presente no alimento, ao mesmo tempo em que ocorre diminuição da microbiota contaminante inicial, já que a *Salmonella* spp. é pouco competitiva. A CBHAM foi diminuindo de acordo com o tempo de armazenamento, sendo encontrados os seguintes valores médios de BHAM:  $2,1 \times 10^6$  UFC/g (0 h),  $1,1 \times 10^6$  UFC/g (48 h) e  $4,8 \times 10^5$  UFC/g (96 h).

Tavares e Serafini (2003) verificaram a qualidade de 100 hambúrgueres de carne bovina na cidade de Goiânia, encontrando resultados diferentes a este estudo, que variaram entre a faixa de  $10^1$  e  $10^4$  UFC/g, todos inferiores ao valor de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g, encontrando-se em condições microbiológicas satisfatórias. Porém, estas análises foram realizadas em hambúrgueres prontos para o consumo. Conseqüentemente, a cocção do produto pode ter tido um efeito de decréscimo do número de BHAM. Neste mesmo estudo não foi evidenciada contaminação por *Salmonella* spp.

Carvalho et al. (2005), ao analisarem cinco amostras de hambúrgueres de frango, não encontraram CBHAM acima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g, sendo que o valor mínimo encontrado foi de  $2,3 \times 10^3$  UFC/g e o valor máximo de  $2,5 \times 10^4$  UFC/g, resultado que caracteriza estes produtos com condições apropriadas para o consumo. Porém, Mota et al. (2009) analisaram 15 amostras de sanduíches (pão, hambúrguer, queijo, alface e tomate) comercializados em três redes de *fast-food* e observaram elevada CBHAM em quatro (26,67%) amostras. A contagem total dos produtos variou de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g a  $6,4 \times 10^5$  UFC/g.

No presente estudo, analisando-se os resultados encontrados, sugere-se que a *Salmonella* spp. é um micro-organismo pouco competitivo em alimentos altamente contaminados por outros micro-organismos. Segundo Boni et al. (2011), a capacidade de resistência da *Salmonella* spp. às condições adversas do meio ambiente ou alimento, pode variar tornando-se difícil o isolamento deste micro-organismo, devido à presença de grande número de outras bactérias na amostra e sua reduzida capacidade competitiva na presença de outros patógenos.

Corroborando para este estudo Brant et al. (2007) afirmaram que a ausência de *Salmonella* spp. pode ser determinada pela sua menor capacidade de competição. Em contrapartida, a sua ocorrência em alimentos está, na maioria das vezes, associada às contagens menores de outros contaminantes.

Porém, o valor absoluto do coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) foi de 0,1606 com o valor crítico absoluto do  $t$

calculado de 1,4375 ( $p=0,1545$ ), sendo menor que os valores tabelados com nível de significância 0,05 e 0,01, mostrando que não houve correlação significativa em relação à contaminação dos hambúrgueres pela *Salmonella* spp. e as altas contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas. Isto é, amostras com alta CBHAM não necessariamente também estarão contaminadas por *Salmonella* spp. e/ou vice-versa.

Tendo em vista o valor de  $p=0,2121$  do coeficiente (-0,3671), estatisticamente não há relação entre a contaminação por *Salmonella* spp. e a CBHAM nos hambúrgueres crus analisados (Figura 1). Além disso, a chance de o hambúrguer cru estar contaminado por *Salmonella* spp. é de apenas 0,6927 vezes maior se a CBHAM for elevada. A probabilidade para ocorrer contaminação por *Salmonella* spp. sem ocorrer CBHAM elevada nos hambúrgueres crus analisados foi de 63,90% e para ocorrer contaminação por *Salmonella* spp. com CBHAM elevada foi de 71,88%.

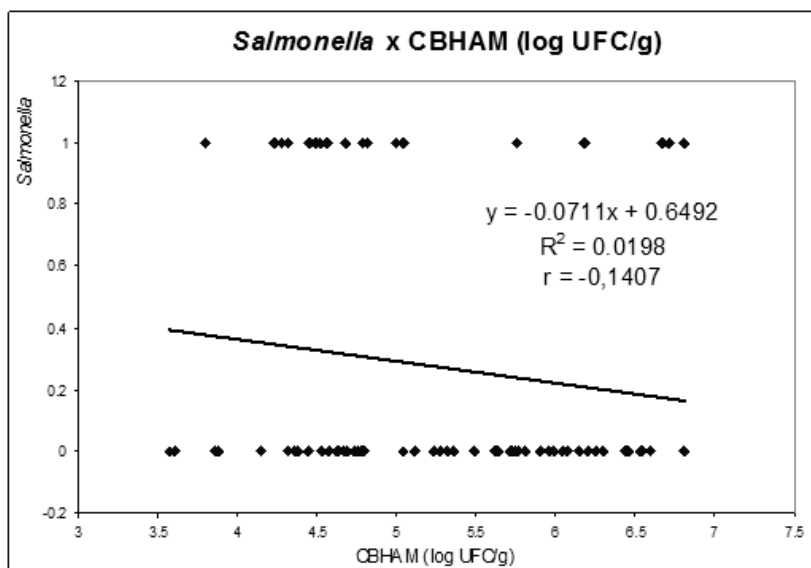


Figura 1: Gráfico de regressão com linha de tendência e valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e correlação ( $r$ ).

Nascimento et al. (2005) afirmaram que a CBHAM constitui um dos melhores indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos. Sendo assim, este método deveria ser usado para análises microbiológicas de hambúrgueres crus, com o objetivo de identificar deficiências na sanitização, problemas no processamento ou em ingredientes na indústria, a fim de diminuir a carga microbiana do produto cru.

## Conclusão

Não houve correlação entre a contagem padrão de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e o isolamento de *Salmonella* spp. nas amostras de hambúrgueres analisadas. Desse modo, não se pode afirmar que a *Salmonella* spp. não é encontrada em alimentos contaminados por alta contagem de outros micro-organismos, pois no caso específico deste trabalho, parte dos hambúrgueres analisados apresentaram alta contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e também contaminação por *Salmonella* ssp.

## Referências

- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. *BioEstat 3.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. Brasília: CNPq. 2003, 290 p.
- BONI, H. F. K.; CARRIJO, A. S.; FASCINA, V. B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. v. 12, n. 1, p. 84-95, 2011.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 20*, de 31 de julho de 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almonds, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 62*, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.
- BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12*, de 2 de janeiro de 2001. Estabelece os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos e Determina os Critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano.
- CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Presença de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. *Arquivos do Instituto Biológico*. v. 72, n. 3, p. 303-307, 2005.
- D'AOUST, J. Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. v. 12, p. 17-40, 1991.
- FERRETTI, R.; MANNAZZU, I.; COCOLIN, L.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 67, n. 2, p. 977-978, 2001.
- GIOMBELLI, A.; SILVA, N. L. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carnes *in natura*. *Revista Higiene Alimentar*. v. 16, n. 95, p. 88-91, 2002.
- KWANG, J.; LITLEDIKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*. v. 22, p. 46-51, 1996.
- LEAL, K. V.; CHAAR, S. A. S.; AYALA, A. B.; ROO, Y. A.; TOLEDO, L. S.; URDANETA, A. G. Comparación de la calidad microbiológica de hamburguesa de pollo elaborada en forma artesanal e industrial. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. v. XVIII, n. 5, p. 624-630, 2008.
- MORTON, R. D. Aerobic plate count. Cap. 7, p. 63-67. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association (APHA). 2001.
- MOTA, J.; TON, N. C.; SIMÕES, J. S.; BELTRAME, M. A. V. Análise microbiológica de sanduíches comercializados em estabelecimentos *fast-food* no município de Vila Velha, ES. *Revista Higiene Alimentar*. v. 23, n. 170/171 (encarte), p. 341-342, 2009.
- NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. Hambúrguer: evolução comercial e padrões microbiológicos. *Boletim CEPPA*. v. 23, n. 1, p. 59-74, 2005.
- PARRA, K.; PIÑERO, M. P.; NARVAÉZ, C.; UZCÁTEGUI, S.; MORENO, L. A.; HUERTA-LEIDENZ, N. Evaluation of microbial and physical-chemistry of frozen hamburger patties expended in Maracaibo, Zulia State, Venezuela. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. v. XII, n. 6, p. 715-720, 2002.
- RAMÍREZ, A. F.; CÓRSER, P. J.; LEAL, K. V. CAGNASSO, M. A.; GONZÁLES, M. P.; URDANETA, A. G. Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento sobre la calidad microbiológica de carne de hamburguesa. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. v. XVI, n. 4, p. 428-437, 2006.
- RIYAZ-UL-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. v. 18, p. 333-339, 2004.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007, 536 p.
- SIQUEIRA, R. S. *Manual de Microbiologia de Alimentos*. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Brasília: EMBRAPA. 1995, 159 p.
- SIQUEIRA, R. S.; DODD, C. E. R.; REES, C. E. D. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 34 (suppl. 1), p. 118-120, 2003.
- TAVARES, T. M.; SERAFINI, A. B. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo *trailers* em Goiânia (GO). *Revista de Patologia Tropical*. v. 32, n. 1, p. 45-52, 2003.
- VAN POUCKE, L. S. G. *Salmonella*-TEK, a rapid screening method for *Salmonella* species in food. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 56, n. 4, p. 924-927, 1990.

*Full Length Research Paper*

# Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. strains isolated from hamburgers

Jorge Luiz Fortuna<sup>1\*</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>2</sup> and Robson Maia Franco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Laboratório de Microbiologia. Campus X. Curso de Ciências Biológicas. Av. Kaikan, s/n – Universitário. Teixeira de Freitas-BA. CEP: 45.995-300. Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal Fluminense (UFF). Faculdade de Veterinária. Niterói, RJ, Brazil.

Accepted 19 December, 2012

**Susceptibility of 45 *Salmonella* spp. strains isolated from beef and beef and chicken hamburgers was evaluated. Twelve antimicrobial drugs were used in the disc diffusion method. A cladogram was constructed and similarity across strains was assessed. Strains were susceptible to co-trimoxazole, chloramphenicol, amikacin, tetracycline and gentamicin (91.11, 91.11, 84.44, 80.0, 77.78%), though resistance was detected against cefotaxime, ampicillin, cephalothin, ceftriaxone, cefotixin, ceftazidime, and aztreonam (88.89, 71.11, 68.89, 53.33, 48.89, 42.22, 35.56%). The least effective antimicrobial drug was cefotaxime (88.89%). A high percentage of multiresistant *Salmonella* spp. strains was observed. This raises concerns as to the high risk for salmonellosis in humans, when these food items are consumed underdone, or by cross-contamination during preparation. Another important aspect in terms of public health is that these infections may become even more severe due to the lower efficacy of antimicrobials in treatments, both in humans and animals.**

**Key words:** Resistance, susceptibility, antimicrobial, *Salmonella*, hamburger, cladogram.

## INTRODUCTION

Antimicrobial agents are commonly employed as growth promoters and in the prevention or treatment of infections in meat and milk producing animals. Nevertheless, the indiscriminate, unsupervised use of these drugs in feeds and water destined to animals represents a serious public health hazard due to the emergence of multiresistant strains responsible for the high prevalence of infectious diseases in humans as well as animals.

The use of antimicrobial agents both in humans and animals may select resistant bacteria populations (White et al., 2002). These drugs are used in animal feeds to treat and prevent bacterial infectious diseases, and as growth promoters. An undesirable outcome of this practice is the emergence of resistant microorganisms and the consequent transmission to humans due to the contamination of animal-derived foods. Estimates say that over 50% of all commercially available antimicrobial

agents are used in the animal-derived food industry (Aarestrup, 1999). Worldwide, considerable amounts of antimicrobial agents are used to promote growth and in prophylaxis, though the use of such drugs in therapy strategies is also significant. In this scenario, bacterial species normally present in animal products are exposed to a substantial and oftentimes constant selective pressure. According to Witte (2004), the selective pressure exerted by antimicrobials as growth promoters in animals used for food production may be behind expressive resistance transfer pools in the environments these animals are reared. Additionally, it has been described that antimicrobial agents used in treatment or prevention of bacterial infections in animals, either in therapy, metaphylaxis, prophylaxis and in growth promotion, belong essentially to the same class of compounds used in human medicine (Witte, 2004; Schwarz et al., 2001).

More specifically, in therapy antimicrobials are used to control an existing bacterial infection in one single individual. In turn, metaphylaxis is the use of antimicrobial

\*Corresponding author. E-mail: [jfortuna@uneb.br](mailto:jfortuna@uneb.br).

agents in a whole group of animals when signs of an infection are detected in one or more individuals, if the whole group is considered to be at risk. Prophylaxis with antimicrobial drugs may be adopted for individual animals as well as groups thereof, via water and food. This strategy may also act as growth promoter (Schwarz et al., 2001).

Resistant *Salmonella* spp. strains have been increasingly isolated in human salmonellosis outbreaks due to the inclusion of antimicrobial agents in animal production feeds, mainly as growth promoters. This poses a public health hazard, due to the transfer of resistant *Salmonella* spp. strains to humans through the consumption of contaminated foods and infectious diseases that are not properly treated.

*Salmonella* spp. strains resistant to antimicrobials represent a risk to public health. These strains are responsible for salmonellosis outbreaks in humans and animals, which are difficult to treat efficiently. The individuals infected with resistant strains are more prone to prolonged, more severe diseases that require treatment in hospital - or that even lead to death - as compared to subjects infected with susceptible strains. Additionally, the indiscriminate use of antimicrobials may select resistant genes in pathogenic bacteria that later can transfer the acquired resistance to different non-pathogenic bacteria species (Aarestrup, 1999). For this reason, monitoring antimicrobial resistance plays an essential role as a means to obtain information on the span and trends of resistance, aiming to plan and observe the effects of treatment (Álvarez-Fernández et al., 2012).

Multiresistance to antimicrobials is particularly problematic in pathogenic bacteria, and may be considered a possible result of the use of different antimicrobial agents (Aarestrup, 1999). In this sense, the widespread emergence of multiresistant *Salmonella* spp. in foods reveals the need for more careful antimicrobial application strategies by farmers, veterinarians and doctors. Apart from this, efforts should be made towards reducing the prevalence of resistant strains of bacteria of this genus in foods, which include the adoption of guidelines for a more careful use of antimicrobial agents in animals used in food production, the enforcement of new food safety regulations, and efforts to reduce pathogen populations in abattoirs (Thakur and Bajaj, 2006).

The increased resistance of microorganisms to antimicrobials may be a consequence of vertical or horizontal resistance gene transfer (Witte, 2004). However, the resistance to antimicrobials may also result from mutations and the acquisition of genes that code for resistance (Fluit, 2005). The emergence of multiresistant *Salmonella* spp. serotypes has become a worldwide concern, since antimicrobial resistance worsens these pathogens' virulence. Resistance and virulence determinants may be localized in the bacterial

chromosome, in transposons or plasmids, grouped in resistance or pathogenicity islands and transferred by movable genetic elements of phagi. In this sense, the presence of both determinants in the transposon or in the same plasmid may be selected by antimicrobial pressure, resulting in *Salmonella* spp. strains that are more resistant to antimicrobials (Wannaprasat et al., 2011). Moreover, *Salmonella* spp. resistance to antimicrobial agents is caused by several mechanisms, such as the production of enzymes that inactivate antimicrobial drugs based on structural degradation or modification, the reduction of antimicrobial penetration in bacterial cells, the activation of antimicrobial efflux pumps, and the emergence of different targets of antimicrobial on bacterial cells (Hur et al., 2012).

Determining the susceptibility and resistance profile of *Salmonella* spp. strains isolated from foods in a given region, apart from being an important epidemiological marker, may be useful in therapeutic procedures in human and veterinary medicine (Baú et al., 2001). Also, due to the ubiquitous character of the microorganism, its pathogenicity and the alarming increase in resistance to antimicrobials, identifying resistant strains is essential in epidemiological studies (Thakur and Bajaj, 2006). In this sense, the objective of the present study was to assess the susceptibility of *Salmonella* spp. strains isolated from hamburgers made with beef and a mixture of beef and chicken sold in the city of Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil.

## MATERIALS AND METHODS

Samples of beef and beef and chicken hamburgers purchased in local supermarkets and butcher's shops in the city of Niterói, Brazil, were analyzed in the Laboratory of Microbiological Control of Animal Products, Department of Food Technology, Veterinary School, Universidade Federal Fluminense.

The microbiological isolation and identification of *Salmonella* spp. were carried out according to Ordinance No. 62, issued by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supplies, Office for the Protection of Agriculture and Livestock, which publishes the official analytical methods used in the microbiological analyses of animal products and water (Brasil, 2003). Strains were isolated and identified as *Salmonella* spp. according to the conventional microbiological growth method. Serological and biochemical confirmation was carried out.

After microbiological confirmation, 45 isolated *Salmonella* spp. strains were tested for susceptibility against 12 different antimicrobial compounds according to the diffusion methodology described by Bauer et al (1966) and interpreted based on standards defined by The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). The antimicrobial agents used were: amikacin, gentamicin, ampicillin, aztreonam, cephalothin, cefotaxime, cefotixin, ceftazidime, ceftriaxone, chloramphenicol, cotrimoxazole and tetracycline.

*Salmonella* spp. strains were inoculated in slanted test tubes containing nutrient agar and incubated at 37°C/24 h. The bacterial inoculum was suspended with saline 0.85% in a 0.5 McFarland scale. Then, the inoculum was seeded on Petri dishes containing Muller Hinton Agar (MHA). A set of previously chosen antimicrobial discs (Polisensidisc™) was placed on dishes, which were then

**Table 1.** Absolute and percentage susceptibility of the 45 *Salmonella* spp. strains isolated from hamburgers to 12 different antimicrobial drugs.

Antimicrobial ( $\mu$ g)	Susceptible		Resistant		Intermediary	
	N	%	N	%	N	%
Amikacin (AMI 30)	38	84.44	4	8.89	3	6.67
Gentamicin (GEN 10)	35	77.78	7	15.56	3	6.67
Ampicilin (AMP 10)	12	26.67	32	71.11	1	2.22
Aztreonam (ATM 30)	20	44.44	16	35.56	9	20.0
Cephalothin (CFL 30)	13	28.89	31	68.89	1	2.22
Cefotaxime (CTX 30)	3	6.67	40	88.89	2	4.44
Cefotixin (CFO 30)	20	44.44	22	48.89	3	6.67
Ceftazidime (CAZ 30)	10	22.22	19	42.22	16	35.56
Ceftriaxone (CRO 30)	18	40.0	24	53.33	3	6.67
Chloramphenicol (CLO 30)	41	91.11	4	8.89	0	0
Co-trimoxazole (SUT 25)	41	91.11	3	6.67	1	2.22
Tetracycline (TET 30)	36	80.0	3	6.67	6	13.33

incubated at 37°C/18-20 h. Susceptibility halos were measured (mm) using a halometer. Then, strains were sorted as susceptible, resistant or as having intermediate resistance to each antimicrobial drug, according to inhibition halo size. The intermediate category includes isolates with antimicrobial minimum inhibitory concentrations that similar to usually attainable blood and tissue levels and for which response rates may be lower than that of susceptible isolates. The intermediate category implies clinical efficacy in body sites where the drugs are physiologically concentrated or when a higher than normal dosage of a drug can be used. This means that the microorganism may be inhibited by achievable concentrations of some drugs, when higher doses may be given or when the infection is in a site where the drug attains higher physiological doses. Resistant isolates are not inhibited by concentration of an antimicrobial drug in a site, or present specific resistance mechanisms.

Percentages of resistant *Salmonella* spp. strains in beef and beef and chicken hamburgers were compared using the Student's t test in the software Bioestat™ 3.0 (Ayres et al., 2003). Similarity analysis, to assess the formation of clusters or clades or microorganisms, was carried out using the software WinClada™ 1.00.08 (Nixon, 2002). The cladogram obtained revealed the similarity across strains, in terms of the categories susceptible, intermediate and resistant. The clade analysis included 12 different characteristics based on the 12 drug used. A binary matrix was constructed (45 strains X 12 antimicrobial drugs), with the values zero, 1 and 2 assigned to susceptible, resistant and intermediate strains, respectively, in the nodes of lines and columns. The dendrograms were obtained by parsimony analysis through heuristic search and constructed according to the single linkage method or the neighbor-joining method using the software Nona™ 2 (Goloboff, 1999).

The similarity analysis enables the formation and identification of significant clusters of individuals or objects of a sample population. Individuals are grouped according to the degree of similarity of variables (characteristics), while elements in distinct groups present different characteristics.

## RESULTS

*Salmonella* spp. presented higher susceptibility to co-trimoxazole (91.11%), chloramphenicol (91.11%),

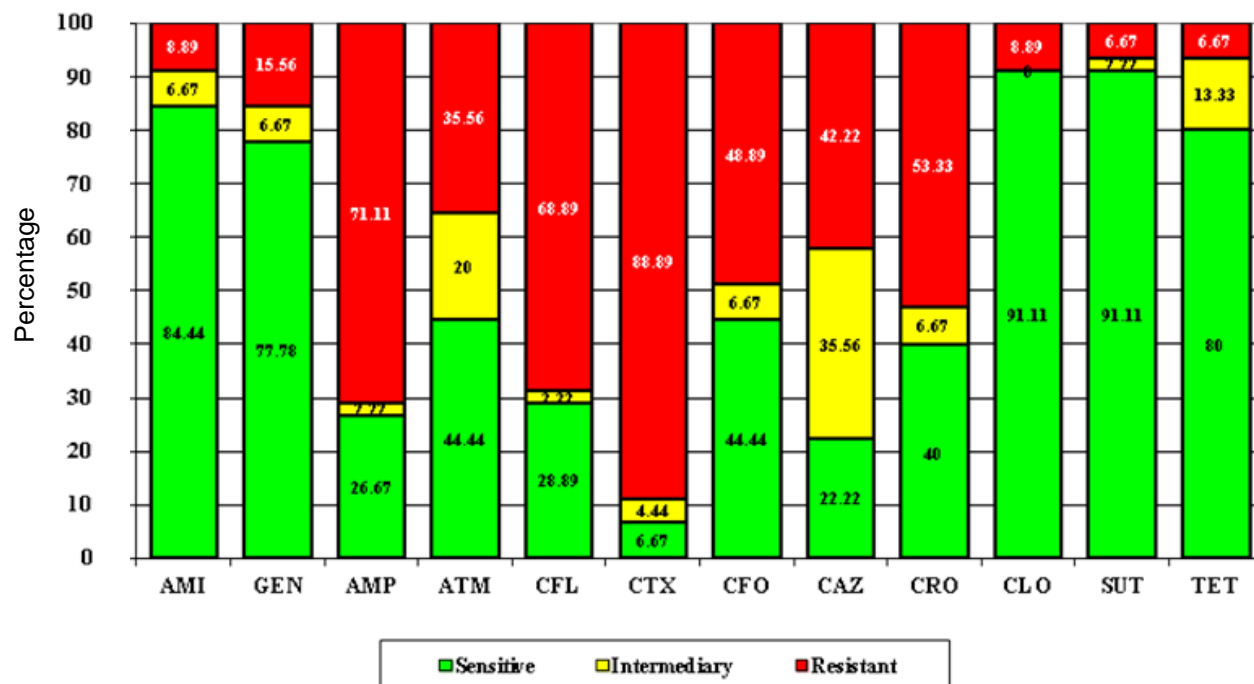
amikacin (84.44%), tetracycline (80.0%) and gentamicin (77.78%). Higher resistance was observed against cefotaxime (88.89%), ampicilin (71.11%), cephalothin (68.89%), ceftriaxone (53.33%), cefoxitin (48.89%), ceftazidime (42.2%) and aztreonam (35.56%) (Table 1).

The most effective antimicrobials, to which most strains were susceptible (41/45), were co-trimoxazole (91.11%) and chloramphenicol (91.11%). The least effective antimicrobial tested, with the highest number of susceptible strains, was cefotaxime (88.89%) (Figure 1).

In terms of type of hamburger (Table 2), *Salmonella* spp. strains isolated from beef hamburgers (n=26) were more susceptible to chloramphenicol (100%), tetracycline (96.15%), co-trimoxazole (92.31%) and amikacin (80.77%). These hamburgers had strains that were particularly resistant to cefotaxime (88.46%). In turn, beef and chicken hamburgers (n=19) contained isolates that were more susceptible to amikacin (89.47%) and co-trimoxazole (89.47%), though they also were resistant to cefotaxime (89.47%).

The Student's t test revealed no statistically significant differences in percentage of resistant strains isolated from beef and beef and chicken hamburgers (absolute value calculated: 0.9461;  $p=0.3644$ , below the significance levels  $\alpha=0.01$  (3.11) and  $\alpha=0.05$  (2.20); df: 11).

Of the 45 *Salmonella* spp. strains tested against the 12 antimicrobial drugs, 42 (93.33%) exhibited resistance to at least one drug. However, if intermediate strains are considered potentially resistant and if multiresistant strains are those that present resistance to two or more antimicrobials, it is then possible to conclude that only three (6.67%) strains have low resistance, with one (2.22%) being susceptible to all drugs tested (strain 19) and two (4.44%) resistant to one antimicrobial only (strains 12 and 21). Consequently, 42 strains (93.33%) were considered multiresistant (Table 3), of which three



**Figure 1.** Susceptibility of 45 *Salmonella* spp. strains isolated from hamburgers to 12 antimicrobial drugs. AMI: Amikacin; GEN: Gentamicin; AMP: Ampicillin; ATM: Aztreonam; CFL: Cephalothin; CTX: Cefotaxime; CFO: Cefotixin; CAZ: Ceftazidime; CRO: Ceftriaxone; CLO: Chloramphenicol; SUT: Co-trimoxazole; TET: Tetracycline.

**Table 2.** Absolute and percentage susceptibility of the 45 *Salmonella* spp. strains isolated from beef and beef and chicken hamburgers to 12 different antimicrobial drugs.

Antimicrobial	Beef Hamburger (n=26)						Mixture Hamburger (n=19) (Beef + Chicken)					
	Susceptible		Resistant		Intermediary		Susceptible		Resistant		Intermediary	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Amikacin	21	80.77	3	11.54	2	7.69	17	89.47	1	5.26	1	5.26
Gentamicin	20	76.92	4	15.38	2	7.69	15	78.95	3	15.79	1	5.26
Ampicillin	7	26.92	19	73.08	0	0	5	26.32	13	68.42	1	5.26
Aztreonam	13	50.0	7	26.92	6	23.08	7	36.84	9	47.37	3	15.79
Cephalothin	6	23.08	20	76.92	0	0	7	36.84	11	57.89	1	5.26
Cefotaxime	1	3.85	23	88.46	2	7.69	2	10.53	17	89.47	0	0
Cefotixin	11	42.31	12	46.15	3	11.54	9	47.37	10	52.63	0	0
Ceftazidime	6	23.08	14	53.85	6	23.08	4	21.05	5	26.32	10	52.63
Ceftriaxone	11	42.31	14	53.85	1	3.85	7	36.84	10	52.63	2	10.53
Chloramphenicol	26	100	0	0	0	0	15	78.95	4	21.05	0	0
Co-trimoxazole	24	92.31	1	3.85	1	3.85	17	89.47	2	10.53	0	0
Tetracycline	25	96.15	0	0	1	3.85	11	57.89	3	15.79	5	26.32

(6.67%) were strains resistant to two drugs, three (6.67%) were resistant to three drugs, five (11.11%) to four, seven (15.56%) to five, six (13.33%) to six, six (13.33%) to seven, seven (15.56%) to eight, three (6.67%) to nine, and two (4.44%) to ten different

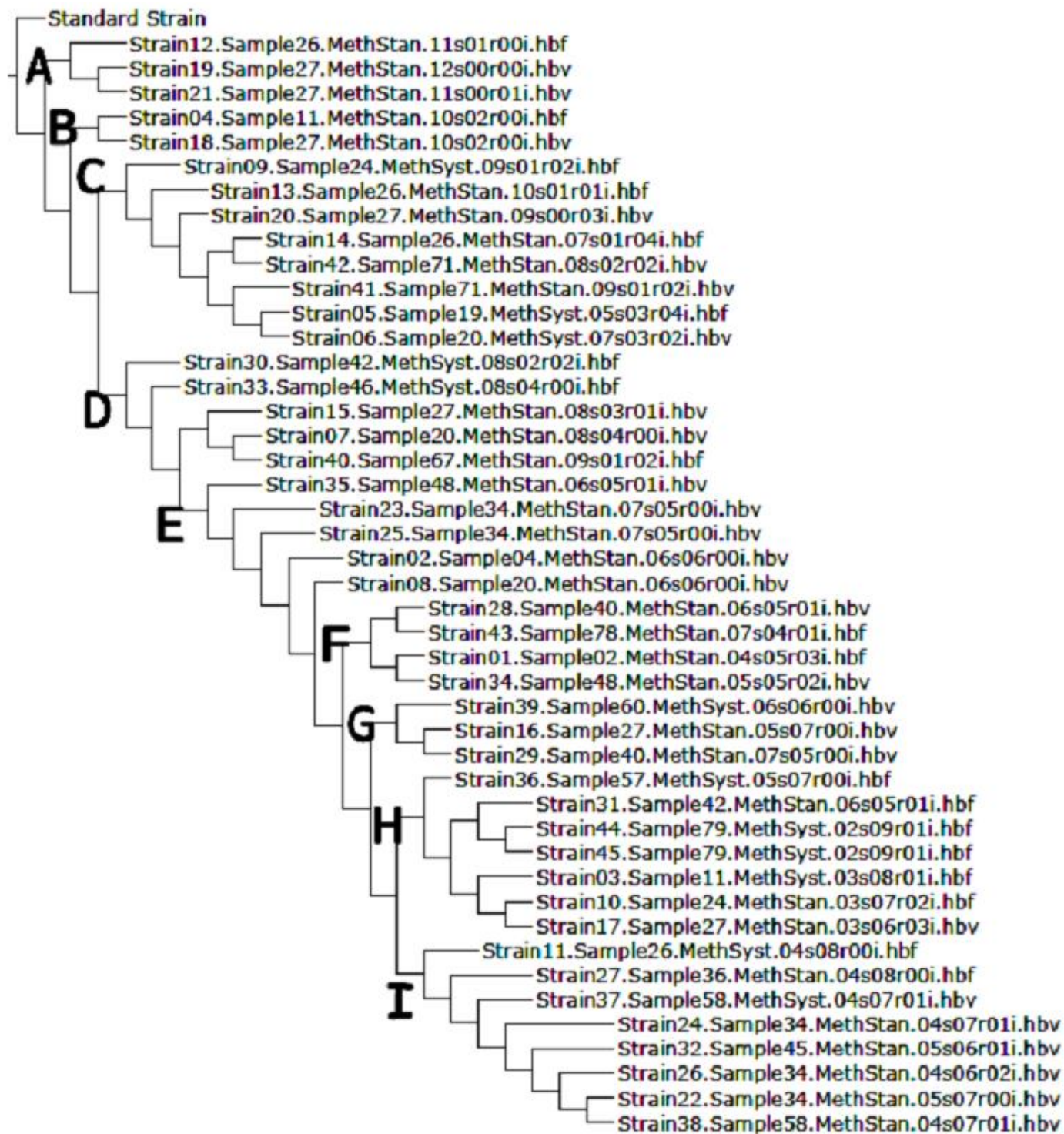
antimicrobial drugs. No strain was resistant to 11 or 12 drugs.

The cladogram constructed revealed some discrepancies between strains. However, it was possible to identify several similar strains. Nine different clusters

**Table 3.** Characterization of the 45 *Salmonella* spp. strains isolated, considering type of hamburgers, microbiological method and resistance profile, against 12 different antimicrobial drugs.

Hamburger	Method	Susceptibility test	
		Resistant	Intermediary
Beef+chicken	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO/CRO	ATM/CAZ/TET
Beef	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	–
Beef+chicken	Salmosyst	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO/CLO	TET
Beef+chicken	Conventional	ATM/CTX	–
Beef+chicken	Salmosyst	GEN/CFL/CTX	AMP/ATM/CAZ/TET
Beef	Salmosyst	CFL/CTX/SUT	ATM/CAZ
Beef	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO	–
Beef	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	–
Beef+chicken	Salmosyst	CTX	CFL/CAZ
Beef+chicken	Conventional	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	AMI/TET
Beef+chicken	Salmosyst	AMI/GEN/ATM/CTX/CFO/CAZ/CRO/TET	–
Beef+chicken	Conventional	AMP	–
Beef+chicken	Conventional	CTX	CAZ
Beef+chicken	Conventional	CTX	GEN/ATM/CAZ/CRO
Beef	Conventional	AMP/CFL/CFO	CTX
Beef	Conventional	AMI/AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	–
Beef	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	AMI/GEN/TET
Beef	Conventional	ATM/CTX	–
Beef	Conventional	–	–
Beef	Conventional	–	ATM/CTX/CAZ
Beef	Conventional	–	ATM
Beef	Conventional	AMI/GEN/AMP/CFL/CTX/CAZ/CRO	–
Beef	Conventional	AMP/CFL/CTX/CAZ/CRO	–
Beef	Conventional	GEN/AMP/ATM/CFL/CTX/CAZ/CRO	CFO
Beef	Conventional	AMP/CFL/CTX/CAZ/CRO	–
Beef	Conventional	AMI/GEN/AMP/ATM/CFL/CTX	CFO/SUT
Beef+chicken	Conventional	GEN/AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	–
Beef	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO/CRO	CAZ
Beef	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ	–
Beef+chicken	Salmosyst	AMP/CTX	CAZ/CRO
Beef+chicken	Conventional	AMP/ATM/CFL/CTX/CRO	CAZ
Beef	Conventional	AMP/ATM/CFL/CTX/CAZ/CRO	CFO
Beef+chicken	Salmosyst	AMP/CTX/CRO/CLO	–
Beef	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO/CRO	ATM/CAZ
Beef	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ	ATM
Beef+chicken	Salmosyst	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	–
Beef	Salmosyst	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CAZ/CRO	GEN
Beef	Conventional	GEN/AMP/ATM/CFL/CTX/CAZ/CRO	AMI
Beef	Salmosyst	AMP/CFL/CTX/CFO/CAZ/ CRO	–
Beef+chicken	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO	TET
Beef	Conventional	CTX	ATM/CAZ
Beef	Conventional	ATM/CTX	CAZ/CRO
Beef+chicken	Conventional	AMP/CFL/CTX/CFO	CAZ
Beef+chicken	Salmosyst	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CRO/CLO/SUT/TET	CAZ
Beef+chicken	Salmosyst	AMP/ATM/CFL/CTX/CFO/CRO/CLO/SUT/TET	CAZ

AMI: Amikacin; GEN: Gentamicin; AMP: Ampicilin; ATM: Aztreonam; CFL: Cephalothin; CTX: Cefotaxime; CFO: Cefotixin; CAZ: Ceftazidime; CRO: Ceftriaxone; CLO: Chloramphenicol; SUT: Co-trimoxazole; TET: Tetracycline.



**Figure 2.** Similarity cladogram for *Salmonella* spp. strains isolated from beef and beef and chicken hamburgers using the software WinClada™. MethStan: Conventional method; MethSyst: Salmosyst method; s: susceptible; r: resistant; i: intermediary; hbv, beef hamburger; hbf, beef and chicken hamburger.

were formed (A, B, C, D, E, F, G, H and I; Figure 2). Cluster A was formed only by susceptible strains, while the other clusters were composed of multiresistant strains. Some strains (04 and 18, cluster B; strains 28,

43, 01 and 34, cluster F), in spite of being isolated from the two kinds of hamburger (beef and beef and chicken) were similar. Oppositely, it was also possible to observe that strains placed in different clusters were present in



one same hamburger sample (strains isolated from sample 27, Figure 2).

## DISCUSSION

In a study that investigated the same antimicrobial agents, Cortez et al. (2006) observed a different behavior as compared to the results reported herein. The authors isolated a total of 29 *Salmonella* spp. strains from samples collected in broilers in an abattoir, 25 (86.2%) of which were resistant to aztreonam, 25 (86.2%) to ampicillin, 21 (72.4%) to tetracycline and 16 (55.2%) to co-trimoxazole. However, similar results were observed for susceptibility, since gentamicin was the drug to which the least strains were resistant (1 strain, 3.45%), followed by amikacin (2 strains, 6.9%). The authors also observed that strains were susceptible to gentamicin (96.5%) and chloramphenicol (48.3%). None of the strains tested was resistant or susceptible to all antimicrobial agents tested.

However, in a previous study, strains isolated from pork were observed to be highly resistant to tetracycline (67%), ampicillin (35%) and chloramphenicol (27%), though lower resistance numbers were reported for gentamicin (5%). Strains isolated from humans were resistant to ampicillin, chloramphenicol, gentamicin (21%) and tetracycline (90%).

Different results were reported by Szych et al. (2001) in a study that investigated 320 *Salmonella* Enterica strains isolated from feces of diarrhea patients and carriers of the pathogen between 1998 and 1999. The authors observed that 91.4 and 21.5% of strains were resistant to tetracycline and ampicillin, respectively. Yet, low resistance was also seen for chloramphenicol and gentamicin.

The susceptibility of strains isolated from beef and beef and chicken hamburgers in the present investigation are similar to those reported in the study of Cardoso et al. (2006) in a study that analyzed resistance of 80 *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler chicken carcasses between 1995 and 1996 resistant to gentamicin and co-trimoxazole.

Strains presenting intermediate resistance levels may be considered resistant. According to the study of Cortez et al. (2006), the prescription of antimicrobial agents against bacteria with intermediate resistance helps select resistant strains. Additionally, intermediate strains may promote the emergence of resistant strains, if antimicrobials are prescribed at concentrations below recommended values or if the infection site is not reached effectively by drugs at appropriate concentrations.

Multiresistance has not as yet been universally defined. Several studies have categorized multiresistant strains as those that are not affected by two or more antimicrobial drugs (Szych et al., 2001; Dargatz et al., 2003). However, recent papers define multiresistance as resistance

against three or more drugs (Wannaprasat et al., 2011). Multiresistant strains have also been considered to be resistant to four or more agents (Castagna et al., 2001). This controversy around a precise, reliable definition of multiresistance makes it difficult to appropriately compare results. Szych et al. (2001) reported that 49.9% of *Salmonella* Enterica strains isolated from feces of diarrhea patients and carriers of the pathogen resisted against two or more antimicrobials. However, in a study that tested 702 strains, 11.7% were shown to be multiresistant, most of which to tetracycline (35.9%), while 10.4% of samples were resistant to ampicillin and to chloramphenicol and no sample was resistant to amikacin and gentamicin (Dargatz et al., 2003). Comparatively, these prevalence values for multiresistance are lower than those reported for 99 strains of *Salmonella* spp. isolated from pigs, where 24 (24.24%) were shown to be multiresistant in a study that stipulated multiresistance as resistance to four or more drugs (Castagna et al., 2001). In the present study, multiresistance was considered to be resistance against two or more drugs.

In a study that considered multiresistance as resistance against at least three drugs, Wannaprasat et al. (2011) evaluated 162 *Salmonella* spp. strains and observed that 89% were resistant to at least one antimicrobial drug, while 63% were multiresistant. The authors also observed that 74% of strains were resistant to tetracycline, and that no strain resisted to ceftriaxone, as opposed to the results of the present study. Also, a study compared the resistance of 40 strains isolated in 1993 to 19 strains isolated in 2006. The authors observed that 100% of strains of the first group presented multiple resistance to at least three drugs (25%), as well as four (52.5%) or five (22.5%) antimicrobials. The strains in the second group were resistant to three (26.3%), four (26.3%), five (10.5%), six (26.3%), seven (5.3%) and 13 (5.3%) different antimicrobial drugs (Álvarez-Fernández et al., 2012). Similarly, Cortez et al. (2006) reported that seven (24.14%) of the 29 *Salmonella* spp. strains isolated in a broiler chicken abattoir were resistant to seven antimicrobial agents, six (20.7%) to eight and four (13.8%) to five.

In a study that assessed the resistance of three *Salmonella* spp. serotypes to antimicrobials, Lynne et al. (2009) found highly resistant *Salmonella* Dublin strains (80% were resistant to between one and five antimicrobials, while 64% were resistant to six or more drugs). The authors also observed high resistance, with 87.5% of *Salmonella* Choleraesuis strains being resistant to at least one antimicrobial, and 37.5% resistant to at least four drugs. *Salmonella* Pullorum was the least resistant microorganism, with 55.5% of isolates resistant to one single antimicrobial drug. The overall results of that study showed high resistance to tetracycline (64.3% of isolates), and that all isolates were resistant to amikacin. These results differed from those reported by

Souza et al. (2010), in a study that analyzed 44 *Salmonella* Typhi strains isolated in the state of Pará, Brazil, of which 10 (22.7%) were resistant to at least one antimicrobial drug.

Ribeiro et al. (2008) analyzed 79 *Salmonella* Enteritidis strains isolated from clinical samples collected from broilers and breeders and environmental samples collected in a chicken broiler plant. The authors observed that 65 (82.3%) were resistant to one or more antimicrobial agents. Of these, 43 (66.1%) resisted to two or more and 22 (33.8%) to only one antimicrobial drug, which are higher prevalences as compared to the values observed in the present study. Oppositely, resistance to tetracycline was found in 53 (67.1%) of strains. Such high prevalence was also observed in a study that analyzed 33 *Salmonella* Hadar strains isolated from chicken samples (Zimmermann et al., 2008).

Graziani et al. (2008) analyzed susceptibility of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Italy between 2002 and 2004 from human and animal sources. The authors observed that 87% of strains isolated from humans and 81% of strains isolated from animals were resistant to at least one antimicrobial drug. High resistance was observed against tetracycline, ampicillin and chloramphenicol (73.6, 67.6 and 32.2% of strains, respectively).

One of the factors behind such high resistance values is the indiscriminate use of antimicrobial drugs with no medical supervision, apart from the fact that in Brazil antibiotics are sometimes sold over the counter, with no prescription. Additionally, the prescription of such drugs with no prior investigation to detect strains hampers an appropriate diagnosis, either due to lack of a suitable structure for the purpose or to misinformation and carelessness by health professionals (Souza et al., 2010).

In veterinary medicine, tetracyclines and sulfonamides can only be prescribed to treat systemic infections. Their application as performance additives or animal feed preservatives is forbidden. Additionally, the production, handling, fractioning, commercialization, importation and use of chloramphenicol in veterinary medicine and in animal feed production are also prohibited. These restrictions may explain the susceptibility of most strains tested against chloramphenicol, co-trimoxazole, and tetracycline, in the present study. However, it is possible to conjecture that these drugs are used indiscriminately in broiler production, since the strains isolated from hamburgers made with beef and chicken meat were resistant to these antimicrobials.

## Conclusion

A high percentage of *Salmonella* spp. strains isolated from beef and beef and chicken hamburgers resistant to the different antimicrobials tested was observed. This

raises concerns as to the high risk for salmonellosis in humans, when these food items are consumed underdone or by cross-contamination with other food items during preparation. Another important aspect in terms of public health is that these infections may become even more severe due to the lower efficacy of antimicrobials in treatments, both in humans and animals.

The results point to the need for more effective strategies to reduce the risk of proliferation and contamination of food by resistant strains, which include the monitoring and inspection concerning the use of antimicrobials in the husbandry of food producing animals. Additionally, as a means of prevention, hamburgers should be cooked and handled appropriately so as to prevent outbreaks of *Salmonella* spp. infections and the spread of multiresistant strains.

## REFERENCES

- Aarestrup FM (1999). Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 12:279-285.
- Álvarez-Fernández E, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, Capita R (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. *Int. J. Food Microbiol.* 153:281-287.
- Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS (2003). BioEstat 3.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. Brasília: CNPq.
- Baú AC, Carvalho JB, Aleixo JAG (2001). Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. *Cienc. Rural* 31(2):303-307.
- Bauer AW, Kirby EM, Sherris JC, Turk M (1996). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4):493-496.
- Brasil (2003). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.
- Cardoso MO, Ribeiro AR, Santos LR, Pilotto F, Moraes, HLS, Salle CTP, Rocha SLS, Nascimento VP (2006). Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Braz. J. Microbiol.* 37:368-371.
- Castagna SMF, Bessa MC, Carvalho DA, Cardoso M, Costa M (2001). Resistência a antimicrobianos de amostras de *Salmonella* spp. Isoladas de suínos abatidos no estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Fac. Vet. UFRGS* 29(1):44-49.
- Cortez ALL, Carvalho ACFB, Ikuno AA, Bürger KP, Vidal-Martins AMC (2006). Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. Isoladas de abatedouros de aves. *Arq. Inst. Biol.* 73(2):157-163.
- Dargatz DA, Fedorka-Cray PJ, Ladely SR, Kopral CA, Ferris KE, Headrick ML (2003). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolates from US cattle in feedlots in 1999 and 2000. *J. Appl. Microbiol.* 95:753-761.
- Fluit AC (2005). Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43(1):1-11.
- Goloboff PA (1999). Nona (NoName) ver. 2. (Published by the author), Tucumán, Argentina.
- Graziani C, Busani L, Dionisi AM, Lucarelli C, Owczarek S, Ricci A, Mancin M, Caprioli A, Luzzi I (2008). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. *Vet. Microbiol.* 128:414-418.
- Hur J, Jawale C, Lee JH (2012). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. *Food Res. Int.* 45:819-830.

- Lynne AM, Dorsey LL, David DE, Foley SL (2009). Characterisation of antibiotic resistance in host-adapted *Salmonella enterica*. Int. J. Antimicrob. Agents 34:169-172.
- NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2003). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standards Eighth. NCCLS document M2-A8, 23(1).
- Nixon KC (2002). WinClada ver. 1.00.08 (Published by the author) Ithaca, New York.
- Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Nascimento VP (2008). Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 60(5):1259-1262.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int. J. Antimicrob. Agents 17:431-437.
- Souza CO, Santos LVS, Ramos FLP, Mota CM (2010). Resistência antimicrobiana de *Salmonella* Typhi identificadas no estado do Pará, Brasil. Rev. Pan-Am. Saúde 1(2):61-65.
- Szych J, Cieslik A, Paciorek J, Kaluzewski S (2001). Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains isolated in Poland from 1998 to 1999. Int. J. Antimicrob. Agents 18:37-42.
- Thakur YR, Bajaj BK (2006). Antibiotic resistance and molecular characterization of poultry isolates of *Salmonella* by RAPD-PCR. World J. Microb. Biot. 22:1177-1183.
- Wannaprasat W, Padungtod P, Chuanchuen R (2011). Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. Int. J. Antimicrob. Agents 37:457-461.
- White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, McDermott PF (2002). Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes Infect. Dis. 4:405-412.
- Witte W (2004). International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. Infect. Genet. Evol. 4(3):187-191.
- Zimmermann FC, Pinheiro D, Cesco MAO, Guayba J, Borsoi A, Borges-Fortes FB, Dalmolin J, Camilotti E, Moraes HLS, Nascimento VP (2008). Resistência antimicrobiana em amostras de *Salmonella* Hadar isoladas de carcaças de frango. Proceedings of the 35<sup>th</sup> Brazilian Congress of Veterinary Medicine.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das amostras de hambúrgueres analisadas através dos métodos microbiológicos, 22 (27,5%) apresentaram-se contaminadas pelo microrganismo *Salmonella* spp., sendo classificadas como em condições sanitárias insatisfatórias e impróprias para o consumo humano, conforme preconiza a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS) (Brasil, 2001). Destas 22 amostras de hambúrgueres positivas para *Salmonella* spp., onze (50,0%) foram detectadas somente pelo método convencional, cinco (22,73%) somente pelo método Salmosyst e seis (27,27%) por ambos os métodos.

No método convencional observou-se a maior capacidade de identificar os verdadeiros positivos, enquanto que no método Salmosyst esse comportamento ocorreu na identificação dos verdadeiros negativos. Quanto à precisão, os resultados dos dois métodos foram caracterizados como aceitáveis quanto à pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres. Porém, estatisticamente não houve diferença significativa nos resultados obtidos tanto pelo método convencional quanto pelo método Salmosyst, podendo os resultados serem atribuídos ao acaso.

O uso do Ágar *Salmonella* Diferencial (ASD) foi muito importante na fase do plaqueamento seletivo devido à facilidade de se identificar colônias típicas de *Salmonella* spp. para serem repicadas para os tubos de TSI e LIA (triagem primária).

De acordo com os resultados demonstrados, foi de suma importância repicar, para a triagem secundária, as colônias selecionadas dos tubos TSI e LIA com as características classificadas também como atípico 1 e atípico 2, pois estas duas características podem servir de base para o isolamento de sorotipos de *Salmonella* spp. atípica, que fermenta Lactose e *Salmonella* Paratyphi, que não descarboxila a Lisina, respectivamente.

A utilização da triagem secundária foi eficiente no que diz respeito a diferenciação entre colônias de *Proteus* spp. e *Salmonella* spp., pois desta forma só prosseguiram para o teste da soroaglutinação àquelas colônias características de *Salmonella* spp., isto é, testes da Urease e da desaminação da Fenilalanina negativos.

Das amostras de hambúrgueres analisadas através da PCR, 18 (22,5%) apresentaram-se contaminadas pelo microrganismo *Salmonella* spp., sendo classificadas como em condições sanitárias microbiológicas insatisfatórias. O tipo de matéria prima do hambúrguer não interferiu na detecção de *Salmonella* spp. A pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus pela PCR foi mais efetiva quando a amostra passou pela etapa de pré-enriquecimento com incubação de 24 horas a 36°C do que a seis horas de incubação. Sendo assim, torna-se de suma importância a utilização deste período de incubação para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos. Verificou-se que com a utilização de mais de um tipo de caldo de pré-enriquecimento, maior a chance de detecção de *Salmonella* spp.

Comparando-se os métodos microbiológicos (convencional e Salmosyst) com o método da reação em cadeia da polimerase, das 80 amostras de hambúrgueres crus analisadas, 32 (40,0%) apresentaram-se contaminadas pelo microrganismo *Salmonella* spp., sendo que destas, 14 (17,5%) foram identificadas somente pelos métodos microbiológicos; 10 (12,5%) somente pelo método da PCR e oito (10,0%) por ambos os métodos. Estatisticamente não houve diferença significativa nos resultados obtidos tanto pelos métodos microbiológicos quanto pelo método Salmosyst, podendo os resultados serem atribuídos ao acaso.

Tanto os hambúrgueres bovinos quanto os mistos representam risco à saúde dos consumidores, sendo necessários uma melhor fiscalização e controle destes produtos por parte da Vigilância Sanitária, objetivando a redução da contaminação por *Salmonella* spp. e/ou quaisquer outros microrganismos patogênicos. Tornou-se evidente que a utilização de mais de um tipo de método de identificação, aumenta a probabilidade de detecção de *Salmonella* spp. em hambúrgueres. Além disso, os três testes foram eficientes, sendo úteis para o monitoramento e controle microbiológico na indústria de produção de alimentos.

A sorologia foi considerada como sendo a melhor capacidade de identificar os verdadeiros positivos, enquanto que o sistema Bactray® I e II foi indicado com melhor capacidade de identificar os verdadeiros negativos. Quanto à precisão, os dois métodos foram considerados como satisfatórios quanto a pesquisa e identificação de *Salmonella* spp. em hambúrgueres. Verificou-se que com a utilização de mais de um tipo de método de identificação, maior a chance de detecção de *Salmonella* spp.

A comercialização de hambúrgueres em açougues e/ou supermercados está sendo procedida de forma equivocada pelos comerciantes, pois estes, em sua maioria, comercializam os hambúrgueres em balcões frigoríficos que não atingem a temperatura ideal de armazenamento do produto, indicada no rótulo pelos próprios fabricantes, que é de no máximo  $-12^{\circ}\text{C}$ . Sendo assim, estes produtos atingem temperaturas ótimas para a multiplicação de microrganismos da microbiota já existente na carne, aumentando o risco do consumidor adquirir uma toxinfecção alimentar.

Torna-se necessário que as indústrias adotem padrões adequados e melhor controle no processamento dos seus produtos cárneos, afim de diminuir a carga microbiana destes produtos. Além de criarem um monitoramento às práticas adequadas de armazenamento e exibição dos hambúrgueres no comércio formal.

Recomenda-se, também, reforçar o sistema de vigilância sanitária e estabelecer maior controle microbiológico na produção dos hambúrgueres tanto nas indústrias, mas principalmente, quanto na forma de exposição deste produto no comércio formal, visando melhorar a qualidade higiênico-sanitária do produto e, conseqüentemente, proteger a saúde dos consumidores.

Não houve correlação entre a contagem padrão de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e o isolamento de *Salmonella* spp. nas amostras de hambúrgueres analisadas. Desse modo não se pode afirmar que a *Salmonella* spp. não é encontrada em alimentos contaminados por alta contagem de outros microrganismos, pois no caso específico deste trabalho parte dos hambúrgueres analisados apresentaram alta contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e também contaminação por *Salmonella* spp.

Encontrou-se alta porcentagem de cepas multirresistentes de *Salmonella* spp. aos diferentes agentes antimicrobianos, isoladas de hambúrgueres comercializados em Niterói-RJ, Brasil. Sendo assim, torna-se preocupante a contaminação destes hambúrgueres por *Salmonella* spp. devido ao aumento do risco de surtos de salmoneloses em humanos caso estes alimentos sejam consumidos após uma cocção insuficiente ou contaminação cruzada com outros alimentos durante a preparação. Outro fator importante para a saúde coletiva é que estas infecções podem se tornar mais graves pela diminuição da eficácia dos antimicrobianos nos tratamentos tanto em humanos quanto em outros animais.

Consequentemente urge a necessidade de se encontrar estratégias para diminuir o risco do desenvolvimento e contaminação de cepas resistentes e/ou multirresistentes em alimentos, tais como um contínuo monitoramento e fiscalização em relação ao uso de antimicrobianos no que diz respeito ao manejo zootécnico dos animais produtores de alimentos. Além disso, por prevenção, os hambúrgueres devem sofrer cocção e manipulação adequadas para se evitar surtos de infecções por *Salmonella* spp. e possível disseminação destas cepas multirresistentes.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABO, S.; RASMUSSEN, O. F.; ROSSEN, L.; SØRENSEN, P. D.; OLSEN, J. E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. v. 7, p. 171-178. 1993.
- AARESTRUP, F. M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 12, p. 279-285. 1999.
- AARESTRUP, F. M.; BAGER, F.; JENSEN, N. E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H. C. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. *APMIS Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. v. 106, p. 606-622. 1998.
- ALBERTS, B.; JOHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2004, 1463 p.
- ALMEIDA, A. S.; GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. *Salmonella* em cortes de carne bovina inteiro e moído. *Revista Higiene Alimentar*. v. 16, n. 96, p. 77-81. 2002.
- ALMEIDA FILHO, E. S.; SIGARINI, C. O.; VALENTE, A. M.; ANDRADE, P. F.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Ocorrência de *Salmonella* spp. em hambúrguer de carne de peru (*Meleagris gallopavo*), comercializado no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Higiene Alimentar*. v. 20, n. 142, p. 132-136. 2006.
- ALTWEGG, M.; VERHOEF, J. Amplification methods in diagnostic microbiology. *Journal of Microbiological Methods*. v. 23, p. 1-2. 1995.
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, C.; CAPITA, R. Prevalence and antimicrobial resistant of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology*. v. 153, p. 281-287. 2012.
- ARANGO, H. G. *Bioestatística. Teórica e Computacional*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005, 423 p.
- ARISSETO, A. P. *Avaliação da qualidade global do hambúrguer tipo calabresa com reduzidos teores de nitrito*. São Paulo. 2003. 145 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 2003.
- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. *BioEstat 3.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. Brasília: CNPq. 2003, 290 p.
- BADA-ALAMBEDJI, R.; FOFANA, A.; SEYDE, M.; AKAKPO, A. J. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 37, p. 510-515. 2006.
- BASCOMBS, S. Enzyme tests in bacterial identification. *Methods Microbiology*. n. 19, p. 105-160. 1987.
- BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil.



*Ciência Rural*. v. 31, n. 2, p. 303-307. 2001.

BAUER, A. W.; KIRBY, E. M.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. v. 45, n. 4, p. 493-496. 1966.

BÄUMLER, A. J.; HEFFRON, F.; REISSBRODT, R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 35, n. 5, p. 1224-1230. 1997.

BECKERS, H. J.; HEIDE, J. V. D.; FENIGSEN-NARUCKA, U.; PETERS, R. Fate of salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Muller-Kauffmann's tetrathionate medium. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 62, p. 97-104. 1987.

BECKERS, H. J.; VAN LEUSDEN, F. M.; MEIJSEN, M. J. M. Reference material for the evaluation of a standard method for the detection of salmonellas in foods and feeding stuffs. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 59, p. 507-512. 1985.

BENNETT, A. R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J. G.; BETTS, R. P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. *Letters in Applied Microbiology*. v. 26, p. 437-441. 1998.

BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. *Bioestatística*. 2. ed. São Paulo: EPU. 1981, 350 p.

BEZERRA, A. C. D.; REIS, R. B.; BASTOS, D. H. M. Microbial quality of hamburgers sold in the streets of Cuiabá-MT, Brazil and vendor hygiene-awareness. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 30, n. 2, p. 520-524. 2010.

BIER, O. *Microbiologia e Imunologia*. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos. 1985, 1234 p.

BLACKBURN, C. W. Rapid and alternative methods for the detection of salmonellas in foods. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 75, p. 199-214. 1993.

BONI, H. F. K.; CARRIJO, A. S.; FASCINA, V. B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. v. 12, n. 1, p. 84-95. 2011.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 09*, de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 20*, de 31 de julho de 2000. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de almôndegas, de apesuntado, de fiambre, de hambúrguer, de kibe, de presunto cozido e de presunto.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 26*, de 09 de julho de

2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 62*, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12*, de 02 de janeiro de 2001. Estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos e determina os critérios para a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). *Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – VEDTHA*. 2011.

BUSSE, M. Media for *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. v. 26, p. 117-131. 1995.

BUZBY, J. C. Children and microbial foodborne illness. *Food Review*. v. 24, n. 2, p. 32-37. 2001.

\_\_\_\_\_. Older adults at risk of complications from microbial foodborne illness. *Food Review*. v. 25, n. 2, p. 30-35. 2002.

CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction in food microbiology. *Journal of Microbiological Methods*. v. 23, p. 89-103. 1995.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; PRIETO, M. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology*. v. 103, p. 1366-1375. 2007.

CARDOSO, M. O.; RIBEIRO, A. R.; SANTOS, L. R.; PILOTTO, F.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; ROCHA, S. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 37, p. 368-371. 2006.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Presença de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. *Arquivos do Instituto Biológico*. v. 72, n. 3, p. 303-307. 2005.

CARVALHO, C. V.; RICCI, G.; LEAL, M. F.; AFFONSO, R. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese. Cap. 3, p. 35-60. In: CARVALHO, C. V.; RICCI, G.; AFFONSO, R. *Guia de Práticas em Biologia Molecular*. São Caetano do Sul: Yendis. 2010, 283 p.

CASTAGNA, S. M. F.; BESSA, M. C.; CARVALHO, D. A.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Resistência a antimicrobianos de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos abatidos no estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. v. 29, n. 1, p. 44-49. 2001.

CASTAGNA, S. M. F.; MULLER, M.; MACAGNAN, M.; RODEMBUSCH, C. R.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. Detection of *Salmonella* spp. From porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 36, p. 373-377. 2005.

CHEUNG, P.; KAM, K. M. Salmonella in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods. *Food Research International*. v. 45, p. 802-808. 2012.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory Standards). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; Fifteenth Informational Supplement*. CLSI/NCCLS document M100-S15. v. 25, n. 1. 2005.

COOK, A.; REID-SMITH, R.; IRWIN, R.; McEWEN, S. A.; VALDIVIESO-GARCIA, A.; RIBBIE, C. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*, *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from retail turkey meat from Southern Ontario, Canada. *Journal of Food Protection*. v. 72, p. 473-481. 2009.

COOKE, V. M.; MILES, R. J.; PRICE, R. G.; RICHARDSON, A. C. A novel chromogenic ester agar medium for detection of *Salmonellae*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, n. 2, p. 807-812. 1999.

CORTEZ, A. L. L.; CARVALHO, A. C. F. B.; IKUNO, A. A.; BÜRGER, K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. *Arquivos do Instituto Biológico*. v. 73, p. 2, p. 157-163. 2006.

CROCI, L.; DELIBATO, E.; VOLPE, G.; DE MEDICI, D.; PALLESCHI, G. Comparison of PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standard culture method for detecting *Salmonella* in meat products. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 70, n. 3, p. 1393-1396. 2004.

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

D'AOUST, J. Y.; SEWELL, A. M.; WARBURTON, D. W. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. v. 16, p. 41-50. 1992.

DARGATZ, D. A.; FEDORKA-CRAY, P. J.; LADELY, S. R.; KOPRAL, C. A.; FERRIS, K. E.; HEADRICK, M. L. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolates from US cattle in feedlots in 1999 and 2000. *Journal of Applied Microbiology*. v. 95, p. 753-761. 2003.

DE MEDICI, D.; PEZZOTTI, G.; MARFOGLIA, C.; CACIOLO, D.; FOSCHI, G.; OREFICE, L. Comparison between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*. v. 45, p. 205-210. 1998.

DE ZUTTER, L.; DE SMEDT, J. M.; ABRAMS, R.; BECKERS, H.; CATTEAU, M.; DE BORCHGRAVE, J.; DEBEVERE, J.; HOEKSTRA, J.; JONKERS, F.; LENGES, J.; NOTERMANS, S.; VAN DAMME, L.; VANDERMEERSCH, R.; VERBRAEKEN, R.; WAES, G. Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vissiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. *International Journal of Food Microbiology*. v. 13, p. 11-20. 1991.

DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; GIRARDELLO, R.; COLUSSI, F. M.; DUARTE, L. F.; PILOTTO, F.; NASCIMENTO, V. P. Microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella* em abatedouro de frango totalmente automatizado, semi-automatizado de grande porte e semi-automatizado de pequeno porte. *Revista Higiene Alimentar*. v. 19, n. 133, p. 79-85. 2005a.

DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; VALLE, S. F.; PILOTTO, F.; RODEMBUSCH, C.; WALD, V. B.; CANAL, C. W.; NASCIMENTO, V. P. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. v. 12, n. 1/3, p. 5-10. 2005b.

EFSA (European Food Safety Authority). ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*. v. 11, n. 4:3129. 2013, 250 p.

FENG, P. Bacteriology Analytical Manual. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. U. S. Food and Drug Administration – FDA. 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109652.htm>> Acesso em: 04 set. 2010.

FERRETTI, R.; MANNAZZU, I.; COCOLIN, L.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 67, n. 2, p. 977-978. 2001.

FIERENS, H.; HUYGHEBAERT, A. Screening of *Salmonella* in naturally contaminated feeds with rapid methods. *International Journal of Food Microbiology*. v. 31, p. 301-309. 1996.

FLÔRES, M. L.; BARBOSA, T. M. C.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R.; LOPES, R. F. F.; KADER, I. I. T. A.; ALBUQUERQUE, M. C. B. Avaliação da reação em cadeia da polimerase na análise de ovos, saladas de batata e maioneses, envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar. *Revista Higiene Alimentar*. v. 16, n. 100, p. 75-82. 2002.

FLÔRES, M. L.; NASCIMENTO, V. P.; KADER, I. I. T. A.; SANTOS, L. R.; PONTES, A. P.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Métodos de extração de DNA para a detecção de *Salmonella* em ovos de galinhas com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. *Ciência Rural*. v. 31, n. 2, p. 315-318. 2001.

FLUIT, A. C. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. v. 43, n. 1, p. 1-11. 2005.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*. v. 10, p. 272-288. 2004.

FLUIT, A. C.; WIDJOJOATMODJO, M. N.; BOX, A. T. A.; TORENSMA, R.; VERRHOEF, J. Rapid detection of *Salmonellae* in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 59, n. 5, p. 1342-1346. 1993.

FORYSTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre: Artmed. 2002, 423 p.

FRANCHIN, P. R.; OGLIARI, P. J.; ANDRADE, D. F.; CHIAPINOTO, M.; LEMOS, G.; REBELATTO, M.; SILVA, I. G.; BATISTA, C. R. V. Comparision of the BAX<sup>®</sup> system with an in-house MSRV method for the detection of *Salmonella* in chicken carcasses and pork meat. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 37, p. 521-526. 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu. 2008, 182 p.

- FRESCHI, C. R.; CARVALHO, L. F. O. S.; OLIVEIRA, C. J. B. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 36, p. 363-367. 2005.
- FRICKER, C. R. The isolation of salmonellas and campylobacters. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 63, p. 99-116. 1987.
- GARRICK, R. C.; SMITH, A. D. Evaluation of Rambach agar for the differentiation of *Salmonella* species from other Enterobacteriaceae. *Letters in Applied Microbiology*. v. 18, p. 187-189. 1994.
- 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. *Journal of Food Protection*. v. 67, p. 1229-1233. 2004.
- GIOMBELLI, A.; SILVA, N. L. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella spp.* em carnes *in natura*. *Revista Higiene Alimentar*. v. 16, n. 95, p. 88-91. 2002.
- GOLOBOFF, P. A. *Nona (NoName) ver. 2*. (Published by the author), Tucumán, Argentina. 1999.
- GOMES, B. C.; FRANCO, B. D. G. M.; MARTINIS, E. C. P. Microbiological food safety issues in Brazil: bacterial pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*. v. 10, n. 3, p. 197-205. 2013.
- GOODING, C. M.; CHOUDARY, P. V. Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. v. 13, p. 341-347. 1999.
- GRAZIANI, C.; BUSANI, L.; DIONISI, A. M.; LUCARELLI, C.; OWCZAREK, S.; RICCI, A.; MANCIN, M.; CAPRIOLI, A.; LUZZI, I. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. *Veterinary Microbiology*. v. 128, p. 414-418. 2008.
- GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. 9. ed. Paris: WHO Collaborating Center for reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur. 2007, 166 p.
- GUERREIRO, L. *Dossiê Técnico. Produção de Hambúrguer*. Rio de Janeiro: REDET (Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro). 2006, 26 p.
- GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. J.; BOCKEMÜKL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 (N. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme *Research in Microbiology*. v. 161, n. 1, p. 26-29. 2010.
- GUTIÉRREZ-COGCO, L.; MONTIEL-VÁZQUEZ, E.; AGUILERA-PÉREZ, P.; GONZÁLEZ-ANDRADE, M. C. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México*. v. 42, n. 6, p. 490-495. 2000.
- HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. *Análise Multivariada de Dados*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman. 2005, 593 p.

- HAUTRIVE, T. P.; OLIVEIRA, V. R.; SILVA, A. R. D.; TERRA, N. N.; CAMPAGNOL, P. C. B. Análise físico-química e sensorial de hambúrguer elaborado com carne de avestruz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 28, p. 95-101. 2008.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (Eds.). Group 5. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. p. 175-289. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Vol. 1. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1994, 787 p.
- HOORFAR, J.; BAGGESEN, D. L.; PORTING, P. H. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. *Journal of Microbiological Methods*. v. 35, p. 77-84. 1999.
- HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. *Food Research International*. v. 45, p. 819-830. 2012.
- IZQUIERDO, P.; ALLARA, M.; TORRES, G.; SÁNCHEZ, M.; PEÑA, G.; SANGRONIS, M. Aminas biógenas y crecimiento bacteriano en carne de hamburguesas. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. v. XIV, n. 1, p. 7-12. 2004.
- JAKABI, M.; BUZZO, A. A.; RISTORI, C. A.; TAVECHIO, A. T.; SAKUMA, H.; PAULA, A. M. R.; GELLI, D. S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* spp. ocorridos na Grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*. 22. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. 2005, 653 p.
- JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2005, 711 p.
- KAWASAKI, S.; KIMURA, B.; FUJII, T. Comparison of TaqMan™ *Salmonella* amplification/detection kit with standard culture procedure for detection of *Salmonella* in meat samples. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. v. 42, n. 1, p. 33-39. 2001.
- KAYSER, F. H.; BIENZ, K. A.; ECKERT, J.; ZINKERNAGEL, R. M. *Medical Microbiology*. New York: Thieme. 2005, 698 p.
- KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALCOGER, I.; FARAH, S. M. S. S.; ABRAHÃO, W. S. M.; RODRIGUES, D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Health Sciences*. v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.
- KWANG, J.; LITLEDIKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*. v. 22, p. 46-51. 1996.
- LABORCLIN. Sistema Bactray. Manual de Técnicas. *Laborclin Produtos para Laboratório Ltda*. Disponível em: <<http://www.laborclin.com.br>> Acesso em: 19 nov. 2009.
- LAPPONI, J. C. *Estatística Usando Excel*. São Paulo: Lapponi. 2000, 450 p.
- LEAL, K. V.; CHAAR, S. A. S.; AYALA, A. B.; ROO, Y. A.; TOLEDO, L. S.; URDANETA, A. G. Comparación de la calidad microbiológica de hamburguesa de pollo elaborada en forma artesanal e industrial. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. v. XVIII, n. 5, p. 624-630. 2008.
- LEVINSON, W.; JAWETZ, E. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed. 2006, 632 p.

- LIMA, J. X.; OLIVEIRA, L. F. O crescimento do restaurante *self-service*: aspectos positivos e negativos para o consumidor. *Revista Higiene Alimentar*. v. 19, n. 128, p. 45-53. 2005.
- LUNDIN, J. I.; DARGATZ, D. A.; WAGNER, B. A.; LOMBARD, J. E.; HILL, A. E.; LADELY, S. R.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial drug resistance of fecal *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. isolates from United States dairy cows. *Foodborne Pathogens and Disease*. v. 5, n. 1, p. 7-19. 2008.
- LYNNE, A. M.; DORSEY, L. L.; DAVID, D. E.; FOLEY, S. L. Characterization of antibiotic resistance in host-adapted *Salmonella enterica*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 34, p. 169-172. 2009.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARCK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed. 2010. 1160 p.
- MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. *Revista do Instituto Adolf Lutz*. v. 64, n. 2, p. 155-161. 2005.
- MANAFI, M. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. *International Journal of Food Microbiology*. v. 31, p. 45-58. 1996.
- MANAFI, M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*. v. 60, p. 205-218. 2000.
- MANAFI, M.; KREIFEL, W.; BASCOMBS, S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostic. *Microbiology Reviews*. v. 55, n. 3, p. 335-348. 1991.
- MANAFI, M.; WILLINGER, B. Comparison of three rapid methods for identification of *Salmonella* spp. *Letters in Applied Microbiology*. v. 19, p. 328-331. 1994.
- MARSIGLIA, M. L.; IKUTA, N.; FONSECA, A. K.; SCHUCH, D. T.; HÖTZEL, I.; OZAKI, L. S.; MARQUES, E. K.; LUNGE, V. R. Development of a combined selective enrichment method and polymerase chain reaction (PCR) assay for sensitive detection of *Salmonella* in food samples. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 13, p. 649-654. 1997.
- MARTINS, G. A.; DONAIRE, D. *Princípios de Estatística*. 4. ed. São Paulo: Atlas. 1990, 255 p.
- McEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases*. v. 34 (Suppl. 3), p. S93-S106. 2002.
- MENDES, A. C. R.; SANTANA NETO, L. G.; COETA, D. S.; ALMEIDA, J. F. Condições de comercialização de cortes cárneos em supermercados da cidade de Salvador, BA. *Revista Higiene Alimentar*. v. 15, n. 83, p. 58-62. 2001.
- MINGOTI, S. A. *Análise de Dados Através de Métodos de Estatística Multivariada. Uma Abordagem Aplicada*. Belo Horizonte: UFMG. 2007, 295 p.
- MORTON, R. D. Aerobic plate count. Cap. 7, p. 63-67. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association (APHA). 2001.
- MOTA, J.; TON, N. C.; SIMÕES, J. S.; BELTRAME, M. A. V. Análise microbiológica de sanduíches comercializados em estabelecimentos fast-food no município de

- Vila Velha, ES. *Revista Higiene Alimentar*. v. 23, n. 170/171 (encarte), p. 341-342. 2009.
- MOTTA, V. T.; WAGNER, M. B. *Bioestatística*. Caxias do Sul: EDUCS. São Paulo: Robe. 2003, 201 p.
- MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. April, p. 56-65. 1990.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. v. 155, p. 335-350. 1987.
- MYNT, M. S.; JOHSON, Y. J.; TABLANTE, N. L.; HECKERT, R. A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology*. v. 23, p. 599-604. 2006
- NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* spp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 32, n. 1, p. 47-51, 2004.
- NARVÁEZ, C. A.; PARRA, K. C.; HUERTA-LEIDENZ, N.; RODAS-GONZÁLEZ, A.; MORENO, L. A. Aislamiento de *Salmonella* y *Escherichia coli* patógenas durante el procesamiento de hamburguesas en una pequeña planta de Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica FCV-LUZ*. v. XV, n. 6, p. 551-559. 2005.
- NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. Hambúrguer: evolução comercial e padrões microbiológicos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA)*. v. 23, n. 1, p. 59-74. 2005.
- NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory Standards). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standards Eighth*. NCCLS document M2-A8. v. 23, n. 1. 2003.
- NIXON, K. C. *WinClada ver. 1.00.08*. Published by the author. Ithaca: NY. 2002.
- OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSH, C. R.; CÉ, M. C.; ROCHA, S. L. S.; CANAL, C. W. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*. v. 36, p. 217-221. 2003.
- OLIVEIRA, S. D.; SANTOS, L. R.; ACHUCH, D. M. T.; SILVA, A. B.; SALLE, C. T. P.; CANAL, C. W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*. v. 87, p. 25-35. 2002.
- PAINTER, J. A.; HOEKSTRA, R. M.; AYERS, T.; TAUXE, R. V.; BRADEN, C. R.; ANGULO, F. J.; GRIFFIN, P. M. Attribution of foodborne illness, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. *Emerging Infections Diseases*. v. 19, n. 3, p. 407-415. 2013.
- PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne. Volume I*. Niterói: EDUFF. Goiânia: UFG. 1995, 586 p.
- PARRA, K.; PIÑERO, M. P.; NARVÁEZ, C.; UZCÁTEGUI, S.; MORENO, L. A.; HUERTA-LEIDENZ, N. Evaluation of microbial and physical-chemistry of frozen hamburger patties expended in Maracaibo, Zulia State, Venezuela. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. v. XII, n. 6, p. 715-720. 2002.
- PATIL, M. D.; PARHAD, N. M. Growth of salmonellas in different enrichment media. *Journal of Applied Bacteriology*. v.61, p. 19-24. 1986.



PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia. Conceitos e Aplicações. Volume 2*. 2. ed. São Paulo: Pearson. 2005, 517 p.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. 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. *Revista de Saúde Pública*. v. 32, n. 5, p.: 477-483, 1998.

PIGNATO, S.; MARINO, A. M.; EMANUELLE, M. C.; IANNOTTA, V.; CARACAPPA, S.; GIAMMANCO, G. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonellae* in foods. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 16, n. 5, p. 1996-1999. 1995.

PRADO, F. F.; VALENTE, D.; OLIVEIRA, C. A. D. Descrição de temperaturas de produtos cárneos, em açougues do município de Ribeirão Preto, SP. *Revista Higiene Alimentar*. v. 23, n. 174/175, p. 32-35. 2009.

RAHN, K.; GRANDIS, S. A.; CLARKE, R. C.; MCEWEN, S. A.; GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; CURTISS III, R.; GYLES, C. L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as specific method for detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*. v. 6, p. 271-279. 1992.

RALL, V. L. M.; MARTIN, J. G. P.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; SILVA, M. G.; RALL, R.; ARAÚJO JR., J. P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e linguças comercializadas na cidade de Botucatu. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v. 46, n. 3, p. 167-174. 2009.

RAMBACH, A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 56, n. 1, p. 301-303. 1990.

RAMÍREZ, A. F.; CÓRSER, P. J.; LEAL, K. V. CAGNASSO, M. A.; GONZÁLES, M. P.; URDANETA, A. G. Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento sobre la calidad microbiológica de carne de hamburguesa. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. v. XVI, n. 4, p. 428-437. 2006

REIS, A. O.; CAMARGO, C. V. *Salmonella* spp. LEMC (Laboratório Especial de Microbiologia Clínica). UNIFESP. Disponível: <<http://www.unifesp.br/dmed/dipa/lemc/bristolTeste14.htm>> Acesso em: 14 out. 2008.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 60, n. 5, p. 1259-1262. 2008.

RISSATO, D. P.; BORGIO, A. P.; MOREIRA, J. P.; BAPTISTA, F.; CONTI, A. C. M.; RIBEIRO, A. B. Detecção de *Salmonella* spp. em água de lavagem de carcaças de frango utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR). *Revista Saúde e Pesquisa*. v. 4, n. 1, p. 35-39. 2011.

RIVAS, M.; CALETTI, M. G.; CHINEN, I.; REFI, S. M.; ROLDÁN, C. D.; CHILLEMI, G.; FIORILLI, G.; BERTOLOTTI, A.; AGUERRE, L.; ESTANI, S. S. Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. v. 9, n. 9, p. 1184-1186. 2003

ROGERS, K. *Bacteria and Viruses*. New York: Britannica Educational Publishing. 2011, 216 p.

RYCHLIK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology*. v. 112, p. 1-10. 2006.

RIYAZ-UL-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. v. 18, p. 333-339, 2004.

RODRIGUES, P. C. *Bioestatística*. 3. ed. Niterói: EdUFF. 2002, 339 p.

RUIZ, J.; NÚÑEZ, M. L.; DÍAZ, J.; LORENTE, I.; PÉREZ, J.; GÓMEZ, J. Comparison of Five plating media for isolation of *Salmonella* species from human stools. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 34, n. 3, p. 686-688. 1996.

SANTA, O. R. D.; ALVAREZ, D. C.; SANTA, H. S. D.; ZANETTE, C. M.; FREITAS, R. J. S.; MACEDO, R. E. F.; TERRA, N. N. Microbiota of sausages obtained by spontaneous fermentation produced in the South of Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 32, n. 4. 2012 (ahead of print), p. 0-0. Disponível: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000117>> Acesso em: 11 dez. 2012.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. v. 29, n. 2, p. 87-92. 2001a.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; RIBEIRO, A. R.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 43, n. 5, p. 247-250. 2001b.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; PONTES, A. P.; FLORES, M. L.; FORELL, F.; PILOTTO, F.; SILVA, N. N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Protocolos para extração de DNA de *Salmonella* spp. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. v. 27, n. 2, p. 93-101. 1999.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerging Infections Diseases*. v. 17, n. 1, p. 7-15. 2011.

SCHRANK, I. S.; MORES, M. A. Z.; COSTA, J. L. A.; FRAZZON, A. P. G.; SONCINI, R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; SILVA, S. C. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. *Veterinary Microbiology*. v. 82, p. 45-53. 2001.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobial in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*. v. 32, p. 201-225. 2001.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 17, p. 431-437. 2001.

SEFTON, A. M. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. *Drugs*. v. 62, p. 557-566. 2002.

- SHETTY, N.; TANG, J. W.; ANDREWS, J. *Infection Disease: Pathogenesis, Prevention and Case Studies*. Oxford: Wiley-Blackwell. 2009, 674 p.
- SIGARINI, C. O.; OLIVEIRA, L. A. T.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CARVALHO, J. C. A. P. Avaliação microbiológica da carne bovina desossada em estabelecimentos comerciais do município de Cuiabá, MT. *Revista Higiene Alimentar*. v. 20, n. 139, p. 89-97. 2006.
- SILVA, D. G.; ÁVILA, L. G.; BERG, R.; SILVA, D. R.; CONDE, S. O.; LEMOS, M. V. F.; FAGLIARI, J. J. Comparação do isolamento microbiológico e de reação em cadeia da polimerase no diagnóstico de salmonelose em bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Typhimurium. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 63, n. 5, p. 1241-1245. 2011.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela. 2007, 536 p.
- SIQUEIRA, R. S. *Manual de Microbiologia de Alimentos*. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Brasília: EMBRAPA. 1995, 159 p.
- SIQUEIRA, R. S.; DODD, C. E. R.; REES, C. E. D. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 34 (Suppl. 1), p. 118-120. 2003.
- SOCKETT, P. N. The economic implications of human *Salmonella* infection. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 71, p. 289-295. 1991
- SOUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, V.; ROSE, N.; DROUIN, P.; SALVAT, G.; COLIN, P. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology*. v. 28, p. 113-117. 1999a.
- SOUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, V.; ROSE, N.; DROUIN, P.; SALVAT, G.; COLIN, P. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology*. v. 29, p. 1-6. 1999b.
- SOUSA, M. F. P.; SOARES, C. O.; CARRIJO, A. S. *Salmonella* sp. em avicultura industrial: diagnóstico imunológico e molecular. *Revista Higiene Alimentar*. v. 21, n. 153, p. 53-58. 2007.
- SOUZA, C. O.; SANTOS, L. V. S.; RAMOS, F. L. P.; MOTA, C. M. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* Typhi identificadas no estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. v. 1, n. 2, p. 61-65. 2010.
- SPIEGEL, M. R. *Estatística*. 3. ed. São Paulo: Makron Books. 1993, 643 p.
- STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; McVEY, S.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 32, n. 7, p. 1742-1749. 1994.
- STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; McVEY, S.; GALLAND, J. C.; CURTIS III, R.; KELLY, S. M.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and

- PCR-hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 33, n. 5, p. 1292-1295. 1995.
- SZYCH, J.; CIESLIK, A.; PACIOREK, J.; KALUZEWSKI, S. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains isolated in Poland from 1998 to 1999. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 18, p. 37-42. 2001.
- TAVARES, T. M.; SERAFINI, A. B. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo *trailers* em Goiânia (GO). *Revista de Patologia Tropical*. v. 32, n. 1, p. 45-52. 2003.
- \_\_\_\_\_. Carnes de hambúrgueres prontas para consumo: aspectos legais e riscos bacterianos. *Revista de Patologia Tropical*. v. 35, n. 1, p. 1-21. 2006.
- TERRA, N. N. *Apontamentos de Tecnologia de Carnes*. São Leopoldo: UNISINOS. 1998, 216 p.
- THAKUR, Y. R.; BAJAJ, B. K. Antibiotic resistance and molecular characterization of poultry isolates of *Salmonella* by RAPD-PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 22, p. 1177-1183. 2006.
- TOLEDO, G. L.; OVALLE, I. I. *Estatística Básica*. 2. ed. São Paulo: Atlas. 1994, 459 p.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed. 2012, 934 p.
- TOZE, S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research*. v. 33, n. 17, p. 3545-3556. 1999.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu. 2008, 760 p.
- TSORAEVA, A.; MARQUES, P. F. Meios cromogênicos e fluorogênicos: uma nova realidade. *Revista Indústria de Laticínios*. Nov/Dez, p. 12-15. 2005.
- TUNON, G. I. L.; NUNES, R. M.; SILVA, T. M.; CALASANS, M. W. M. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp. Isolada de carne de frango resfriada comercializada em Aracaju, Sergipe. *Boletim Epidemiológico Paulista*. v. 5, n. 52, p. 4-6. 2008.
- VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciência e Agrotecnologia*. v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.
- VAN POUCKE, L. S. G. *Salmonella*-TEK, a rapid screening method for *Salmonella* species in food. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 56, n. 4, p. 924-927. 1990.
- VAZ, C. S.; STRECK, A. F.; MICHAEL, G. B.; MARKS, F. S.; RODRIGUES, D. P.; REIS, E. M.; CARDOSO, M. R.; CANAL, C. W. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poultry Science*. v. 89, p. 1530-1536. 2010.
- VELGE, P.; WIEDEMANN, A.; ROSSELIN, M.; ABED, N.; BOUMART, Z.; CHAUSSÉ, A. M.; GRÉPINET, O.; NAMDARI, F.; ROCHE, S. M.; ROSSIGNOL, A.; VIRLOGEUX-PAYANT, I. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new

paradigm for Salmonella pathogenesis. *Microbiology Open*. v. 1, n. 3, p. 243-258. 2012.

VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 14, p. 327-335. 2000.

VAN SCHOTHORST, M.; RENAUD, A. M. Malachite green pre-enrichment medium for improved salmonella isolation from heavily contaminated samples. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 59, p. 223-230. 1985.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. *Elementos de Estatística*. 2. ed. São Paulo: Atlas. 1995, 159 p.

VIEIRA-PINTO, M.; OLIVEIRA, M.; BERNARDO, F.; MARTINS, C. Rapid detection of *Salmonella sp.* in pork samples using fluorescent *in situ* hybridization: a comparison with VIDAS<sup>®</sup>-SLM system and ISO 6579 cultural method. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 59, n. 6, p. 1388-1393. 2007.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A. G. *Genética Humana. Problemas e Abordagens*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000, 684 p.

VON RÜCKERT, D. A. S.; PINTO, P. S. A.; RODRIGUES, A. C. A.; BRAGA, M. D.; BEVILACQUA, P. D.; PINTO, M. S. Métodos de pesquisa de *Salmonella sp.* durante o abate de frangos. *Revista Higiene Alimentar*. v. 20, n. 146, p. 49-54. 2006.

WAAGE, A. S.; VARDUND, T.; LUND, V.; KAPPERUD, G. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *Journal of Applied Microbiology*. v. 87, p. 418-428. 1999.

WANNAPRASAT, W.; PADUNGTOD, P.; CHUANCHUEN, R. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 37, p. 457-461. 2011.

WHITE, D. G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D. D.; McDERMOTT, P. F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes and Infectious Diseases*. v. 4, p. 405-412. 2002.

WITTE, W. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*. v. 4, n. 3, p. 187-191. 2004.

ZAHRAEI, T. S.; MAHZOUNIEH, M.; SAEEDZADEH, A. Detection of *invA* gene in isolated Salmonella from broilers by PCR method. *International Journal of Poultry Sciences*. v. 4, p. 557-559. 2005.

ZIMERMANN, F. C.; PINHEIRO, D.; CESCO, M. A. O.; GUAYBA, J.; BORSOI, A.; BORGES-FORTES, F. B.; DALMOLIN, J.; CAMILOTTI, E.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Resistência antimicrobiana em amostras de *Salmonella* Hadar isoladas de carcaças de frango. CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (CONBRAVET), 35, 2008, Local. *Anais...* Gramado: ExpoGramado-RS. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0750-1.pdf>> Acesso em: 24 ago. 2012.