

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

**STEFANI FARO DE NOVAES**

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE CARPACCIO DE  
CARNE E PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS AGENTES  
ANTIMICROBIANOS**

**NITERÓI  
2013**

STEFANI FARO DE NOVAES

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE CARPACCIO DE CARNE E PERFIL DE  
RESISTÊNCIA AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

Niterói

2013

STEFANI FARO DE NOVAES

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE CARPACCIO DE CARNE E PERFIL DE  
RESISTÊNCIA AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Robson Maia Franco - UFF  
Orientador

---

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento – UFF

---

Prof. Dra. Karen Signori Pereira - UFRJ

Niterói  
2013

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por todas as oportunidades que me proporcionou.

À minha família, especialmente à minha mãe Laéde de Fátima, que esteve presente em todos os momentos, acreditando em meu sucesso profissional, incentivando-me e amparando-me a seguir em frente. Saiba que a minha conquista também é sua.

Ao meu namorado Lauro Machado pelo apoio, carinho, cumplicidade e companheirismo, não só nos momentos bons, mas principalmente nas horas difíceis da minha vida.

Aos meus amigos Vinícius Alves, Marilu Lanzarin, Daniel Oster e Letícia Aquino. Com vocês as incansáveis horas, inclusive em sábados e domingos, no Laboratório de Controle Microbiológico não seriam tão divertidas. Obrigada pela ajuda durante a realização das análises, não apenas pelo trabalho braçal, mas pelo apoio e incentivo. Mesmo longe continuo tendo um carinho enorme por vocês.

À equipe técnica, demais mestrandos e doutorandos, estagiários e bolsistas dos Laboratórios de Controle Microbiológico e Físico Químico pelo apoio durante a realização do estudo.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Robson Maia Franco por confiar no meu trabalho, por dedicar muitas de suas horas a ajudar-me com as análises bacteriológicas e por ser mais que um professor, ser um amigo. Com você aprendi, acima de tudo, a ser uma pessoa mais justa e ética com meus valores e com a minha profissão.

Ao Prof. Dr. Sérgio Borges Mano, que antes mesmo do meu ingresso no curso de mestrado, ajudou-me, com toda paciência, a entender o processo de seleção, tirando minhas dúvidas e incentivando-me a participar do programa. Sua ajuda foi essencial.

Ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento e à professora Prof. Dra. Ana Beatriz Monteiro, que apesar de todos os seus afazeres, disponibilizaram seu tempo para ajudar-me no tratamento estatístico dos dados deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Adam Conte Júnior pela paciência, incentivo e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos.

À Prof. Dra. Karen Signori Pereira pelas pertinentes sugestões dadas para o aperfeiçoamento do projeto deste trabalho.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-graduação, que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o curso.

## RESUMO

O “carpaccio” é um prato elaborado a partir de finas fatias de carne bovina, consumido cru e que requer alta manipulação no preparo. Com isso, surge a preocupação com a qualidade higiênico sanitária, visto a possibilidade de transmissão de patógenos e ocorrência de surtos alimentares. Objetivou-se no presente estudo verificar a qualidade bacteriológica de 50 amostras adquiridas de bares e restaurantes e analisar a resistência bacteriana frente aos agentes antimicrobianos. As análises bacteriológicas contemplaram a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM) e bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas (CBHAP); a contagem de coliformes totais e termotolerantes; o isolamento, identificação e sorologia de *Escherichia coli*; a contagem de estafilococos coagulase positiva; o isolamento, identificação e sorologia de *Salmonella* spp.; o isolamento e identificação de *Listeria* spp.; e o teste de resistência aos antimicrobianos. A determinação da temperatura e pH também foram realizadas e correlacionadas com os resultados analíticos obtidos. As CBHAM e CBHAP determinaram que 13% e 2,2% das amostras, respectivamente, estavam acima do padrão estabelecido. Contagens de coliformes totais e termotolerantes alcançaram o valor de 5,83 e 4,70 log UFC/g, respectivamente, sendo 30% dos bares e 47% dos restaurantes não conformes. Além disso, 5% das amostras de bares e 23% de restaurantes estavam contaminadas com *E. coli*, tendo o grupo EHEC como o mais encontrado, principalmente os sorotipos O157, O26, O55 e O158. Na análise de estafilococos coagulase positiva 45% dos bares e 43% dos restaurantes apresentando resultados insatisfatórios, com 100% das estirpes multirresistentes. Na análise de *Salmonella* spp., 15% das amostras de bares e 17% de restaurantes estavam contaminadas com estirpes resistentes a ampicilina, cefalotina, cefoxitina, ceftadizina, aztreonam, ceftriaxona e cefotaxima. Constatou-se também que 20% das amostras obtidas de restaurantes e 35% de bares estavam contaminadas com *Listeria* spp., sendo *L. welshimeri* isolada com maior frequência (81,82%), seguida de *L. grayi*, (13,66%) e *L. monocytogenes* (4,55%), cujo comportamento resistente ocorreu frente a todos os agentes antimicrobianos testados, exceto à tetraciclina. Com relação à temperatura e ao pH, 30% das amostras apresentaram temperatura acima do ideal e apenas duas possuíam

valores de pH acima do máximo permitido. Devido às elevadas contagens bacterianas e a presença de bactérias potencialmente patogênicas, concluiu-se que os carpaccios são comercializados em condições higiênicas e sanitárias insatisfatórias, o que torna esta matriz alimentícia um risco potencial à saúde do consumidor. A confirmação de estirpes resistentes aos antimicrobianos e a alta taxa de multirresistência constituem grave problema de saúde coletiva, especialmente para grupos de risco.

Palavras-chave: Carpaccio. Contaminação do alimento. Higiene do alimento. Análise bacteriológica.

## ABSTRACT

Carpaccio is a thinly sliced piece of raw beef meat, eaten raw and that requires high handling in preparation, which leads to concern about its hygienic and sanitary quality, because the possibility of disease transmission and outbreaks. The objective of this study was to assess the bacteriological quality of 50 samples of carpaccio acquired from bars and restaurants and analyze bacterial resistance against antimicrobial agents. Bacteriological analysis contemplated the count of aerobic mesophilic heterotrophic bacteria (CAMHB) and aerobic psychrotrophic heterotrophic bacteria (CAPHB); total and fecal coliforms bacteria counts; isolation and serological identification of *Escherichia coli*; counts of positive-coagulase staphylococci; isolation and serological identification of *Salmonella* spp.; isolation and identification of *Listeria* spp.; and antimicrobial resistance test. The determination of temperature and pH of the samples also were made and compared with the analytical results obtained. The CAMHB and CAPHB determined that 13% and 2.2% of samples, respectively, were above the established standard. Counts of total and fecal coliforms reached the value of 5.83 and 4.70 log CFU/g, respectively, and 30% of bars and 47% of restaurants were non-compliant. In addition, 5% of samples of bars and 23% of restaurants were infected with *E. coli*, with EHEC most founded mainly serotypes O157, O26, O55 and O158. In the analysis of coagulase positive, 45% of bars and 43% of restaurants showed unsatisfactory results, with 100% of multiresistant strains. In the analysis of *Salmonella* spp., 15% of samples of bars and 17% of restaurants were contaminated with strains resistant to ampicillin, cephalothin, cefoxitin, ceftadizina, aztreonam, cefotaxime and ceftriaxone. It was also founded that 20% of samples from restaurants and 35% of bars were contaminated with *Listeria* spp., being *L. welshimeri* most frequently isolated (81.82%), followed by *L. grayi*, (13.66%) and *L. monocytogenes* (4.55%), whose behavior was resistant against all antimicrobials tested, except tetracycline. With respect to temperature and pH, 30% of the samples were above the ideal temperature and possessed only two pH values above the maximum allowed. Because of the high bacterial counts and the presence of potentially pathogenic bacteria, concluded that the carpaccios are marketed in unsatisfactory hygienic and sanitary conditions, which makes this food a potential risk to consumer health. The confirmation of resistant strains to antimicrobials and the

high rate of multidrug resistance constitute serious public health problem, especially for risk groups.

Keywords: Bacteriological analysis. Carpaccio. Food contamination. Food hygiene.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1** Representação das reações bioquímicas das diferentes *Listeria* spp. (BRASIL, 2003), p.55
- Fig. 1** Colônias típicas de *E. coli*, isoladas em Ágar Eosina Azul de Metileno com centro preto e brilho verde metálico, p.39
- Fig. 2** Provas bioquímicas de *E. coli* típicas representada, da esquerda para direita, por tubos indicando prova de indol positiva, VM positiva, VP negativa e citrato negativa, p.41
- Fig. 3** Prova da aglutinação em placa com resultado positivo para sorologia de *E. coli*, p.42
- Fig. 4** Testes confirmativos para estafilococos coagulase positivo. À esquerda prova da catalase positiva, com formação de bolhas. À direita prova da coagulase positiva com a formação de coágulos no fundo dos tubos, p.44
- Fig. 5** Provas de triagem para *Salmonella* spp. À esquerda prova da descarboxilação da lisina positiva e à direita reação típica em Ágar TSI, p.47
- Fig. 6** Provas de triagem para *Salmonella* spp. À esquerda o comportamento em meio SIM, sendo o primeiro tubo característico de *Salmonella* spp. À direita a prova da desaminação da fenilalanina, p.49
- Fig. 7** Incubação em caldo Fraser. À esquerda tubo controle e demais tubos escurecidos devido à hidrólise da esculina, p.51
- Fig. 8** Confirmação bioquímica de *Listeria* spp. À esquerda esfregaço constando bastonetes Gram positivos. Ao meio crescimento móvel em forma de guarda-chuva. À direita prova de redução de nitrato, com tubo negativo e tubo positivo induzido quimicamente, p.52
- Fig. 9** CAMP teste. S (*S. aureus* beta-hemolítico) e R (*R. equi*). Reação positiva próxima à linha S, com atividade hemolítica, e negativa próxima à linha R, p.54
- Fig. 10** Teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. A placa à esquerda é característica de resistência aos antimicrobianos testados, sem formação de halo de inibição. A placa à direita apresenta halos de inibição do inóculo frente a alguns antimicrobianos, p.56
- Fig. 11** Frequência de estabelecimentos em não conformidade com padrões fixados para contagens de coliformes termotolerantes e presença de *E. coli*, p.62
- Fig. 12** Frequência de estabelecimentos em não conformidade com padrões fixados para contagens de estafilococos coagulase positiva, p.67
- Fig. 13** Frequência de estabelecimentos em não conformidade com padrões fixados para *Salmonella* spp., p.69
- Fig. 14** Frequência encontrada de *Listeria* spp. em amostras de “carpaccio” comercializadas em bares e restaurantes, p.73

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Resultado das contagens de BHAM e BHAP realizadas em “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes, p.58
- TABELA 2** - Resultado das contagens de coliformes totais, termotolerantes e *E.coli* realizadas em “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes, p.60
- TABELA 3** - Classificação de colônias típicas de *E. coli* patogênicas isoladas de “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes, p.63
- TABELA 4** - Sorogrupos indicadores de *E. coli* patogênicas isoladas de “carpaccios” comercializado em bares e restaurantes, p.63
- TABELA 5** - Comportamento das sete estirpes de *E. coli* patogênicas isoladas de “carpaccios” frente aos antimicrobianos, p.64
- TABELA 6** - Resultado das contagens de estafilococos coagulase positiva realizadas em “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes, p.65
- TABELA 7** - Comportamento das quatro estirpes de estafilococos coagulase positiva isoladas de “carpaccio” frente aos antimicrobianos, p.67
- TABELA 8** - Resultado do isolamento de *Salmonella* spp. de acordo com os meios utilizados no estudo, p.70
- TABELA 9** - Comportamento das onze estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de “carpaccio” frente aos antimicrobianos, p.71
- TABELA 10** - Frequência de isolamento de *Listeria* spp. em amostras de “carpaccio”, de acordo com o meio de plaqueamento utilizado, p.75
- TABELA 11** - Comportamento das espécies de *Listeria* isoladas de “carpaccio”, frente aos agentes antimicrobianos, p.76
- TABELA 12** - Valores de temperatura e pH das amostras de “carpaccio” provenientes de bares e restaurantes, p.77

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Ágar Padrão para Contagem
APHA	“American Public Health Association”
ATCC	“American Type Culture Collection”
ATN	Ágar Triptose com ácido nalidíxico
BHAM	Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas
BHAP	Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas
BHI	“Brain Heart Infusion”
CDC	“Center for Disease Control and Prevention”
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente
DNA	“Deoxyribonucleic acid”
EAggEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica clássica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
FAO	“Food and Agriculture Organization”
KOH	Hidróxido de potássio
LANARA	Laboratório Nacional de Referência Animal
LIA	Lisine Iron Agar
LPM	“Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam”
MILI	Motilidade-Indol-Lisina
MMA	“Mc Bride Listeria Agar”
SIM	Motilidade Indol Sulfito
SSP	Solução Salina Peptonada
TSI	“Triple Sugar Iron”
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFF	Universidade Federal Fluminense
UVM	Caldo Universidade de Vermont Modificado
VM	Vermelho de metila
VP	“Voges-Proskauer”
WHO	“World Health Organization”

## SUMÁRIO

**AGRADECIMENTOS**, p.3

**RESUMO**, p.5

**ABSTRACT**, p. 7

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**, p.9

**LISTA DE TABELAS**, p.10

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**, p.11

**1 INTRODUÇÃO**, p.15

**2 OBJETIVOS**, p.17

2.1 OBJETIVO GERAL, p.17

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p.17

**3 JUSTIFICATIVAS**, p.18

**4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, p.19

4.1 "CARPACCIO" DE CARNE, p.19

4.1.1 **Temperatura**, p.20

4.1.2 **pH**, p.21

4.2 BACTÉRIAS DE INTERESSE NA PESQUISA, p.22

4.2.1 **Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas**, p.23

4.2.2 **Coliformes totais, termotolerantes e *E. coli***, p.24

4.2.3 **Estafilococos coagulase positivo**, p.26

4.2.4 ***Salmonella spp.***, p.27

4.2.5 ***Listeria spp.***, p.29

4.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS, p.31

**5 MATERIAL E MÉTODOS**, p.33

5.1 MATERIAL PERMANENTE, p.33

5.2 MATERIAL DE CONSUMO, p.34

### 5.3 MÉTODOS, p.32

#### 5.3.1 Colheita, acondicionamento e transporte das amostras, p.34

#### 5.3.2 Preparo das subamostras para processamento analítico, p.35

#### 5.3.3 Determinação do pH, p.36

#### 5.3.4 Análises bacteriológicas, p.36

##### 5.3.4.1 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas, p.37

##### 5.3.4.2 Contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e isolamento, identificação e sorologia de *E. coli*, p.37

##### 5.3.4.3 Contagem de Estafilococos coagulase positiva, p.43

##### 5.3.4.4 Isolamento, identificação e sorologia de *Salmonella* spp., p.45

##### 5.3.4.5 Isolamento e identificação de *Listeria* spp., p.50

#### 5.3.5 Teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, p.55

### 5.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA, p.57

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p.58

### 6.1 BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS PSICOTRÓFICAS, p.58

### 6.2 COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *E. coli*, p.60

### 6.3 ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA, p.65

### 6.4 *Salmonella* spp., p.68

### 6.5 *Listeria* spp., p.73

### 6.6 TEMPERATURA E pH, p.77

## 7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES, p.79

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.83

## 9 APÊNDICES, p.96

### 9.1 ARTIGO SUBMETIDOS A PERÍODICOS CIENTÍFICOS, p.96

#### 9.1.1 Contaminação bacteriana de carpaccios de carne bovina comercializados em bares e restaurantes, p.96

#### 9.1.2 Ocorrência e susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* patogênica isoladas de carpaccio de carne bovina, p.96

9.1.3 ***Listeria* spp. em carpaccio de carne bovina e perfil de resistência aos agentes antimicrobianos, p.94**

9.2 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS, p.94

9.2.1 **Qualidade de carpaccios de carne provenientes de bares e restaurantes, p.94**

9.2.2 **Estafilococos coagulase positivo em carpaccio de carne bovina, p.94**

## 1 INTRODUÇÃO

A segurança dos alimentos é requisito primordial para os diversos segmentos do setor alimentício, desde os consumidores até os órgãos responsáveis pela saúde coletiva. Além disso, é notável a mudança nos hábitos alimentares dos próprios consumidores, que se tornaram mais exigentes, buscando alimentos saudáveis e que não representem risco à saúde.

Com base nas informações divulgadas pelo Ministério da Saúde através da vigilância epidemiológica, entre 2000 e 2011, foram notificados 8.663 surtos, com 163.425 pessoas doentes e 112 óbitos registrados e associados a doenças causadas por agentes etiológicos presentes em matrizes alimentares, ainda que exista a estimativa que um expressivo número de surtos seja ignorado e não notificado. Na transmissão de microrganismos patogênicos, diversos tipos de alimentos foram comprovadamente envolvidos e a carne bovina foi considerada como uma das classes de alimentos mais associada a surtos alimentares, responsável por 358 casos em que o alimento foi identificado (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2011).

A real ocorrência das doenças ocasionadas por agentes etiológicos contaminantes de alimentos não é conhecida na sua totalidade e há muitas razões para este fato. Na maior parte dos países não há obrigatoriedade de relatar às autoridades de saúde coletiva as doenças provocadas pela ingestão de alimentos. Nos poucos países que dispõem de um sistema de registro, como no Brasil, há muita falta de informação, devido ao fato de que tanto o paciente quanto o médico não estão plenamente conscientes do papel dos alimentos como origem da enfermidade. Além disso, o alimento responsável nem sempre está disponível para análise. Ainda assim, segundo a “World Health Organization” (2007), estima-se que ocorra por ano 1,8 milhões de óbitos por esta causa no mundo.

Os produtos cárneos são frequentemente envolvidos em surtos, pois são bastante suscetíveis à contaminação por microrganismos, deteriorantes ou patogênicos, além de possuir fatores intrínsecos favoráveis à multiplicação bacteriana. Além disso, após o fatiamento e a manipulação, a carne é exposta a diversos fatores que podem comprometer a sua qualidade, tornando-se um perigo à saúde do ingestor. Desta forma, o “carpaccio” de carne é considerado um alimento

crítico, visto que é um prato pronto para consumo, altamente manipulado, a base de carne bovina crua e que necessita de um controle rigoroso sobre a qualidade microbiológica para o consumo seguro.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a qualidade bacteriológica de “carpaccios” adquiridos em bares e restaurantes do município de Niterói, Rio de Janeiro, e analisar o perfil de resistência bacteriana frente aos agentes antimicrobianos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a temperatura das amostras no momento da aquisição;
- Verificar o pH das amostras de “carpaccio”;
- Enumerar bactérias heterotróficas, aeróbias e mesófilas;
- Enumerar bactérias heterotróficas, aeróbias e psicrotólicas;
- Enumerar coliformes totais e termotolerantes;
- Isolar, identificar e realizar a sorologia para *Escherichia coli*;
- Contar estafilococos coagulase positiva;
- Isolar, identificar e realizar a sorologia para *Salmonella* spp.;
- Avaliar a eficiência dos meios utilizados para isolamento de *Salmonella* spp.;
- Isolar e identificar *Listeria* spp.;
- Avaliar a eficiência dos meios utilizados para isolamento de *Listeria* spp.;
- Verificar se as amostras de “carpaccio” estavam dentro dos padrões microbiológicos exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, contidos na Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001);
- Comparar os resultados analíticos encontrados entre bares e restaurantes;
- Realizar o perfil de resistência frente aos agentes antimicrobianos das estirpes bacterianas patogênicas isoladas e identificadas, como *E. coli*, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp.
- Verificar se houve associação entre temperatura, pH e microbiota encontrada nas amostras.

### 3 JUSTIFICATIVAS

Devido ao elevado número de surtos de doenças que ocorrem no país causados por agentes etiológicos presentes em alimentos e a frequente associação da carne bovina como alimento envolvido nos casos, surge a preocupação com a qualidade bacteriológica de pratos a base de carne, especialmente os que requerem grande manipulação no preparo e não passam por tratamento térmico antes do consumo, como o “carpaccio”.

Além disso, com base no levantamento bibliográfico realizado, observou-se a inexistência de trabalhos nacionais e internacionais direcionados à avaliação microbiológica de “carpaccio” e resistência bacteriana, assim como a verificação da conformidade com os padrões estabelecidos pela legislação vigente.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 “CARPACCIO” DE CARNE

“Carpaccio” de carne é um prato a base de finas fatias de carne crua, preparadas a partir dos músculos *Semitendinosus* dos bovinos. Este produto é tradicionalmente ingerido cru, com azeite, queijo parmesão e especiarias diversas. Nos últimos anos, o “carpaccio” se tornou um prato muito popular e facilmente encontrado em bares e restaurantes. E para atender a demanda de seu consumo, a produção em larga escala também aumentou significativamente, de modo que o produto pode ser encontrado em lojas de varejo, armazenados sob embalagem a vácuo ou atmosfera modificada (LUCQUIN et al., 2012).

A carne bovina é uma excelente fonte de proteínas de alto valor biológico, de vitaminas do complexo B e minerais essenciais como, ferro e zinco. O elevado valor nutritivo associado às características sensoriais excepcionais converte a carne em um dos alimentos mais valorizados pelo consumidor. Entretanto os alimentos cárneos, particularmente aqueles que passam por maior manipulação, como as carnes fatiadas, constituem-se excelente meio de cultura devido à elevada porcentagem de umidade, ao pH próximo da neutralidade e à composição rica em nutrientes, favorecendo a instalação, a sobrevivência e a multiplicação de inúmeros microrganismos capazes de provocar doenças nos humanos (ORDÓÑEZ, 2005).

A exposição da carne a contaminações ocorre em todas as fases de produção, iniciando pelo abate e processamento, até a oferta ao consumidor final (PARDI et al., 2001). Facas, panos, mãos e roupas de operários podem atuar como intermediário na contaminação durante o processamento. Nos serviços de alimentação ocorrem contaminações cruzadas adicionais a partir dos utensílios, como tábuas, facas, recipientes e equipamentos, como os fatiadores (DEN AANTREKKER et al., 2003; PAPADOPOULOU et al., 2012).

O fatiamento é uma etapa crucial no controle da qualidade microbiana do alimento, pois a superfície do cortador pode representar uma importante fonte de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, que podem ocasionar ainda, a formação de biofilme em sua superfície. Biofilme pode ser definido como uma

camada de microrganismos viáveis ou não viáveis, ancorados em uma dada superfície através de substâncias poliméricas que conferem capacidade de adesão à microbiota (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; KESKINEM; TODD; RYSER, 2008).

A formação do biofilme inclui as etapas de contato com o microrganismo, colonização com produção de substâncias poliméricas, como polissacarídeos e proteínas, e maturação. Superfícies mal sanificadas podem proporcionar a condição necessária para a adesão microbiana (OLIVEIRA et al., 2006).

Considerando os possíveis riscos de contaminação nos pontos de processamento, torna-se necessária a avaliação das condições higiênico sanitárias dos estabelecimentos, bem como a orientação dos manipuladores, tendo em vista que os alimentos prontos para consumo contaminados são reconhecidos como potentes veiculadores de patógenos causadores de doenças (OLIVEIRA et al., 2005; PEREZ-RODRIGUEZ et al., 2010).

A manipulação incorreta e a deficiência nos procedimentos voltados à garantia da qualidade, além da falta de informação sobre a importância da segurança dos alimentos, levam à ocorrência de inúmeros casos de infecção e intoxicação alimentares (FREON; REOLON, 2006).

Após a contaminação são desencadeadas alterações microbianas na carne *in natura*, que se devem a fatores de caráter físico, químico e bioquímico do próprio alimento conhecidos como intrínsecos e a fatores do ambiente conhecidos como extrínsecos. A temperatura da carne fresca e o pH atuam como principais fatores para limitação da viabilidade e multiplicação de microrganismos deteriorantes e patogênicos (KOUTSOUMANIS et al., 2006).

#### 4.1.1 Temperatura

A aplicação do frio na carne é um método de conservação que promove a inibição do crescimento microbiano afetando a duração da fase de latência, a velocidade de multiplicação e influencia nas exigências nutricionais e na composição química e enzimática das células (HOFFMANN, 2001).

O metabolismo e a proliferação dos diversos microrganismos durante a refrigeração são muito variáveis. O crescimento microbiano pode ser possível em

uma faixa ampla, sendo 35°C a temperatura ótima da maioria dos patógenos. Do ponto de vista sanitário, sabe-se que, salvo algumas exceções, os microrganismos patogênicos, como salmonelas e estafilococos, não se proliferam em temperaturas abaixo de 5°C. Portanto, é muito importante destacar que as carnes frescas devem ser conservadas sob refrigeração, no máximo até 4°C, até o momento de serem consumidas para assegurar sua qualidade microbiológica. Abusos de temperatura em qualquer fase da produção e preparo podem resultar em perda da sua qualidade e diminuição significativa da validade da carne (INGHAM et al., 2004; ORDÓÑEZ, 2005). Contudo, a temperatura é um parâmetro básico a ser verificado durante a avaliação da qualidade do alimento, que muitas vezes é armazenado sob altas temperaturas, colocando em risco a saúde do consumidor (CONCEIÇÃO; GONÇALVES, 2009; GÓES et al., 2004).

Assim, a manutenção da cadeia de frio se torna um método eficaz para controlar o crescimento de microrganismos em produtos alimentícios. No entanto, patógenos psicrótrópicos, como *Listeria monocytogenes*, ainda são capazes de se desenvolver entre 0°C e 7°C, atingindo doses infectantes para o consumidor, apesar de que quanto mais baixa for a temperatura, menor será a sua velocidade de multiplicação (FRANCO; LANDGRAF, 2007; PÉREZ-RODRIGUEZ et al., 2010).

#### 4.1.2 pH

O pH mede a concentração de íons hidrogênio de um alimento ou solução e quanto mais elevada for a concentração, maior é o caráter ácido e menor o valor de pH (HOFFMANN, 2001).

Os microrganismos possuem valores de pH mínimo, ótimo e máximo para sua multiplicação, sendo o pH em torno da neutralidade, entre 6,5 e 7,5, o mais favorável para a maioria dos patógenos. A faixa entre 6,0 a 7,0 é ótima para multiplicação de *Staphylococcus aureus*, enquanto que para *Salmonella* spp. é de 6,0 a 7,5 e para *Escherichia coli* de 6,0 a 8,0. Já *Listeria monocytogenes* se desenvolve melhor em pH 6,0 a 8,0, podendo crescer em uma faixa maior, entre 5,0 e 9,0. Ressalta-se, contudo, que esses valores não podem ser considerados precisos, visto que podem sofrer influência de outros fatores (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

O crescimento microbiano fora de sua faixa ótima de pH resulta em uma fase de latência ou de adaptação maior, refletindo o tempo necessário para que os microrganismos modifiquem o pH do meio externo para sua faixa de pH ideal (JAY, 2005). Desta forma, o pH é considerado um fator intrínseco dos alimentos de fundamental importância na limitação do desenvolvimento dos diferentes microrganismos (HOFFMANN, 2001).

A carne bovina fresca é um alimento classificado como de baixa acidez que possui o valor de pH aproximado entre 5,1 e 6,2, o que determina alta suscetibilidade à multiplicação da maioria dos microrganismos presentes (FRANCO; LANDGRAF, 2007). Além disso, como preconizado nos Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal – LANARA, a carne própria para consumo deve ter pH máximo de 6,4, indicando consumo imediato e, acima deste valor, considera-se início do processo de decomposição e a carne se torna imprópria para consumo (BRASIL, 1989).

#### 4.2 BACTÉRIAS DE INTERESSE NA PESQUISA

A carne em suas diversas preparações é o alimento mais comumente envolvido em surtos com agentes etiológicos de doenças alimentares. Em uma pesquisa sobre a ocorrência de surtos na cidade do Rio de Janeiro, verificou-se que os alimentos de origem animal representavam o maior risco epidemiológico sendo responsáveis por 67,6% dos casos. E observou-se também que o maior número de surtos ocorreu em serviços de alimentação, como restaurantes, cozinhas industriais, creches, escolas e hospitais (FERNANDEZ et al., 2003). No Brasil, conforme dados epidemiológicos de 2000 a 2011, 1296 surtos ocorreram em restaurantes e padarias (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2011). Os surtos podem ser atribuídos a deficiências na utilização das boas práticas de manipulação e análise de perigos e pontos críticos de controle por parte dos estabelecimentos, impossibilitando a garantia da produção de alimentos seguros (EBONE; CAVALLI; LOPES, 2011).

Os perigos potenciais ligados a patógenos em carne são a presença de microrganismos, como *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, *Yersinia enterocolitica* e *Clostridium*

*perfringens* que geralmente tem acesso ao alimento devido a condições inadequadas de manipulação (LUCHESE et al., 2003). Na Resolução-RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) constam os padrões microbiológicos aceitáveis para pratos prontos para consumo a base de carne crua, como “carpaccio” e define o máximo de  $10^2$  UFC de Coliformes a 45°C/g,  $5 \times 10^3$  UFC de Estafilococos coagulase positiva/g e ausência de *Salmonella* spp./25g para amostras indicativas (BRASIL, 2001).

Devido à carne bovina crua fatiada possuir maior área de superfície e de ser um alimento altamente manuseado permite o desenvolvimento de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas, tanto as deteriorantes como as patogênicas, como no caso de *Listeria* spp., que se desenvolvem na carne estocada sob temperatura de refrigeração (MANTILLA et al., 2007).

#### **4.2.1 Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas**

Os microrganismos, individualmente ou em grupo, crescem em uma ampla faixa de temperatura. Os mais comumente encontrados em carnes frescas são os mesófilos, os quais apresentam maior velocidade de crescimento entre 20°C e 45°C e possuem temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 40°C (JAY, 2005).

A contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (BHAM) é indicador geral de populações bacterianas nos alimentos. Não diferencia tipos de bactérias, mas pode ser útil na avaliação da qualidade geral do produto, práticas de manipulação, matérias primas utilizadas, condições de processamento e validade comercial (SILVA et al., 2010). Diversos autores, como Lundgren et al. (2009), Julião e Costa (2002) e Motta e Belmont (2000), utilizaram a contagem de BHAM como parâmetro na avaliação da qualidade da carne bovina.

Os psicotróficos são microrganismos que crescem em alimentos sob refrigeração, entre 0 a 7°C, mas apresentam temperatura ótima acima de 20°C. Na classificação tradicional dos microrganismos em função da temperatura, os psicotróficos pertencem a um subgrupo dos mesófilos e estão distribuídos em diversos gêneros, incluindo cocos e bastonetes, esporogênicos e não

esporogênicos. Algumas bactérias patogênicas também são psicrotróficas, incluindo *Listeria monocytogenes* e algumas estirpes de *E.coli* enteropatogênica (SILVA et al., 2010).

#### 4.2.2 Coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*

Os coliformes totais são bacilos Gram negativos, não formadores de esporos, que pertencem a um subgrupo da família Enterobacteriaceae capazes de fermentar a lactose e produzir ácido e gás em 24 a 48 horas a 35°C. Diversas espécies pertencem a este grupo, dentre as quais se destacam bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente e também bactérias não entéricas. Podem crescer em pH entre 4,4 a 9,0 e em temperaturas que variam entre -2°C a 50°C, entretanto, em alimentos, o crescimento é lento a 5°C. Conseguem se multiplicar em presença de sais biliares, os quais inibem o crescimento de bactérias Gram positivas (HOLT et al., 1994a).

O grupo dos coliformes termotolerantes, anteriormente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C com produção de gás. Com essa definição objetivou-se, em princípio, selecionar apenas as enterobactérias originárias do trato gastrointestinal, como a *Escherichia coli*, porém, sabe-se que o grupo inclui membros de origem não fecal, como *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*. Em função disso, o termo coliformes fecais tem sido, gradativamente, substituído por coliformes termotolerantes (HOLT et al., 1994a).

A premissa de que elevados números de coliformes termotolerantes em alimentos estão correlacionados com contaminação fecal já não é válida, pois as enterobactérias mencionadas não são obrigatoriamente habitantes do trato intestinal de animais de sangue quente, podendo ser encontradas em reservatórios naturais. Além disso, são organismos comuns nos ambientes de manipulação de alimentos, podendo se tornar parte da microbiota residente (SILVA et al., 2010).

Com base nesses fatos, a “Food and Agriculture Organization” (FAO) e a “World Health Organization” (WHO) concluíram que não é possível avaliar a

inocuidade de alimentos em função do nível de coliformes termotolerantes, porém pode ser aplicado como indicador das condições de higiene dos processos de manipulação, visto que são facilmente inativados por sanitizantes, e podem indicar contaminação pós-processo em alimentos tratados termicamente (SILVA et al., 2010). Cetinkaya et al. (2012) utilizaram a contagem de coliformes e de *E. coli* na avaliação da qualidade microbiológica de um prato conhecido como “cig kofte”, que assim como o “carpaccio”, é a base de carne crua.

Embora a maioria das estirpes de *E. coli* não seja considerada patogênica, esses microrganismos podem atuar como oportunistas, causando infecções em hospedeiros imunodeprimidos. Já estirpes patogênicas, quando ingeridas, causam distúrbios gastrointestinais em indivíduos saudáveis (FENG; WEAGANT; GRANT, 2002).

As linhagens de *E. coli* patogênicas são agrupadas em seis classes: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). O quadro clínico das infecções causadas por *E. coli* depende da estirpe e sua patogenicidade, bem como idade e estado de saúde do indivíduo (GERMANO; GERMANO, 2001). Diversos autores verificaram a alta frequência de *E. coli* patogênica em produtos cárneos e ressaltam o perigo real no consumo de alimentos contaminados (MOHAMMED, 2012; RHEE et al., 2009; SCARCELLI; PIATTI, 2002).

Alguns sorotipos, como O45, O26, O91, O103, O111, O121, O145 e O157, podem ser classificados, ainda, como verotoxigênicos e acarretam infecções consideradas como uma das mais sérias formas de doença transmitida pelo alimento e podem causar complicações fatais. Os principais sintomas incluem dores abdominais, diarreia aquosa e sanguinolenta e vômitos. Complicações como a síndrome urêmica hemolítica e a trombocitopenia púrpura podem ocorrer em alguns casos (MANNING et al., 2007; PRAGER; ANNEMULLER; TSCHAPE, 2005).

A preocupação é ainda maior quando se trata de estirpes resistentes aos principais agentes antimicrobianos utilizados na terapêutica de infecções, como sugeriram Arslan e Eyi (2011), Koo e Woo (2012) e Zhao et al. (2012), configurando sérios riscos à saúde pública.

### 4.2.3 Estafilococos coagulase positivo

O gênero *Staphylococcus* compreende diversas espécies e subespécies, que se encontram amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente encontradas nas mucosas de mamíferos e aves, e a partir deste foco, atingem a pele, pêlos, feridas, água, ar, alimentos e superfícies que entram em contato com o portador (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

Desde a sua proposição em 1884, o gênero *Staphylococcus* tem sido classificado dentro da família Micrococcaceae e somente em 2001, com o avanço da biologia molecular, estudos genéticos, perfis de ácidos graxos, composição da parede celular e, principalmente, estudos com RNA ribossômico que o gênero foi incluído na família Staphylococcaceae (GARRITY; HOLT, 2001).

Os estafilococos são cocos Gram-positivos que formam aglomerados de células semelhantes a cachos de uvas, imóveis, anaeróbios facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido, não fotossintético, não esporulado, catalase positivo, oxidase negativo e capazes de crescer em meio contendo 10% de cloreto de sódio. São microrganismos mesófilos, com temperatura de desenvolvimento entre 7 a 48°C, com ótima de 37°C (HOLT et al, 1994b).

No gênero, *Staphylococcus aureus* sempre foi a espécie mais importante relacionada com uma série de infecções e intoxicações em humanos. Vários fatores de virulência são responsáveis pelos sintomas e gravidade das infecções e incluem as hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , a leucocidina e um grupo de superantígenos tóxicos pirogênicos. A toxina da síndrome do choque tóxico e as enterotoxinas estafilocócicas, que causam a intoxicação alimentar estafilocócica, formam o grupo de superantígenos (CUNHA, 2007). São resistentes à cocção e às enzimas proteolíticas e sua inativação depende da temperatura, bem como, da pureza, composição e pH do meio (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

A produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* coagulase negativa foi observada em vários estudos realizados sob condições de laboratório e demonstrou-se que também as espécies coagulase negativas podem ser causadoras de intoxicação alimentar em potencial e já foram envolvidas em alguns surtos de intoxicação estafilocócica (BORELLI et al., 2006; CARMO et al., 2002; OLIVEIRA et al, 2010; RODRIGUEZ et al., 1996; VERNOZY-ROZAND et al., 1996).

Os principais sintomas ocorrem de duas a seis horas após a ingestão da toxina e incluem náuseas, vômitos, diarreias, dor abdominal e dor de cabeça. O quadro clínico é relativamente brando, com duração de algumas horas até dois dias, podendo, algumas vezes, se apresentar severo e requerer hospitalização. Isso ocorre em virtude da quantidade ingerida e da suscetibilidade do indivíduo, e inclui sintomas de desidratação, cefaleia, sudorese e alteração da temperatura corporal. As mortes são raras, porém podem ocorrer em crianças e idosos (SILVA et al., 2010).

As carnes e produtos cárneos são alimentos frequentemente incriminados em surtos e oferecem maior risco quando são muito manipulados durante o preparo e/ou quando permanecem à temperatura ambiente depois da produção. Os manipuladores são a fonte mais comum de contaminação, embora os equipamentos e superfícies do ambiente também possam contaminar os alimentos (ANDRADE; SILVA; BRABES, 2003; EVANGELISTA-BARRETO; VIEIRA, 2003; OLIVEIRA et al., 2008; VANZO; AZEVEDO, 2003).

A resistência das estirpes de estafilococos coagulase positivo aos agentes antimicrobianos também permanece como problema que requer consideração, apesar do constante desenvolvimento de antimicrobianos cada vez mais específicos e de largo espectro (ACCO et al., 2003; PERESI et al., 2006; RODRIGUES et al., 1997). Além disso, a elevada ocorrência de resistência múltipla apresenta risco potencial para a saúde coletiva e pode dificultar o tratamento de doenças humanas e de animais, agravando quadros clínicos potencialmente curáveis (PESAVENTO et al., 2007; RODRIGUES; VESGA, 2005).

#### 4.2.4 ***Salmonella* spp.**

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, definido como bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. A classificação e a nomenclatura são controversas, pois oficialmente o gênero é composto por uma única espécie, *Salmonella choleraesuis*, dividida em sete subespécies. Porém, em 1987, foi realizada uma proposta de mudança do nome para *Salmonella enterica* e, em 1989, a proposta de elevação da subespécie

*bongori* à categoria de espécie. Essas propostas receberam apoio unânime e foram adotadas pelo “US Center for Disease Control and Prevention” (CDC), “American Society for Microbiology” e “World Health Organization” (WHO), apesar de não oficializada (HOLT et al., 1994c; SILVA et al., 2010).

Em estudos epidemiológicos pouco se utiliza a classificação de *Salmonella* em espécies, sendo a nomenclatura mais conhecida relacionada com a sorotipagem, baseada na composição dos antígenos de superfície, que são os antígenos somáticos, flagelares e os capsulares (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

Entre as principais características bioquímicas de *Salmonella* spp. destacam-se que são oxidase negativa, não produzem butilenoglicol (Voges-Proskauer negativas) nem fenilalanina deaminase. Normalmente são móveis, exceto os sorotipos Gallinarum e Pullorum. Reduzem nitrato a nitrito e são vermelho de metila positivas. A faixa de temperatura para crescimento ótima está entre 35° e 43°C (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 1996). Para o isolamento de *Salmonella* spp., existem diferentes tipos de meios de cultura disponíveis no mercado e a seleção do meio mais adequado permite a obtenção de maior especificidade e sensibilidade na detecção. Por isso, em diversos estudos, há avaliações de eficiência de caldos e ágaros seletivos, visto que são determinantes em etapas críticas durante a análise (GELLI; RISTORI; BUZZO, 2003; RALL et al., 2005; SCHÖNENBRÜCHER; MALLINSON; BÜLTE, 2008; TASKILA; TUOMOLA; OJANO, 2012)

O principal habitat das salmonelas é o trato intestinal de humanos e animais e podem provocar doenças que costumam ser divididas em três grupos: a febre tifóide, causada por *Salmonella* Typhi; febres entéricas, causadas por *Salmonella* Paratyphi; e as enterocolites, também conhecidas como salmoneloses, causadas pelos demais sorotipos do gênero (SILVA et al., 2010).

A febre tifóide só acomete os humanos, e normalmente, é transmitida por água e alimentos contaminados por material fecal. Os sintomas são muito graves e incluem septicemia, febre, diarreia e vômitos. Como os humanos são os reservatórios da *Salmonella* Typhi, os portadores costumam ser a principal fonte de contaminação do alimento. As febres entéricas são semelhantes à febre tifóide, porém com sintomas mais brandos. Já as salmoneloses, podem acometer humanos e animais e caracterizam-se por sintomas que incluem diarreia, vômitos, febres e dores abdominais que duram cerca de um a quatro dias. Em crianças, idosos e

imunodeprimidos a doença pode ser grave (FRANCO; LANDGRAF, 2007; GERMANO; GERMANO, 2001).

*Salmonella* é o principal agente de doenças de origem alimentar em várias partes do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005), sendo reportada em diversos trabalhos com altas frequências, principalmente, em estudos com carne bovina (ALMEIDA; GONÇALVES; FRANCO, 2002; ETHELBERG et al., 2007; MREMA; MPUCHANE; GASHE, 2006; PANISELLO et al., 2000). Também, com base nos dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (2011), é o agente etiológico mais associado a surtos no Brasil, sendo responsável por cerca de 1.660 surtos no período de 2000 a 2011.

Além disso, na literatura há diversos trabalhos que comprovam a resistência de estirpes de *Salmonella* spp. aos agentes antimicrobianos, configurando um problema subjacente que dificulta o tratamento de infecções gerando um risco considerável para saúde coletiva (ARSLAN; EYI, 2010; DALLAL et al., 2010; DIAS et al., 2008; PEREZ-MONTANO et al., 2012; THONG; MODARRESSI, 2011).

#### 4.2.5 *Listeria* spp.

Listérias são bastonetes Gram positivos, não produtoras de esporo, anaeróbias facultativas, anteriormente denominadas Listerella. Porém em 1940 sua denominação mudou para Listeria. As espécies reconhecidas são: *L. denitrificans*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* (DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH, 2011; HOLT et al, 1994d).

O gênero possui reação positiva para catalase e negativa para oxidase, possui faixa de crescimento entre 2°C a 44°C, apesar de existirem relatos sobre crescimento a 0°C e resistência a congelamento e descongelamento. Com relação à concentração de sal, constatou-se sua sobrevivência em 10,5% e 13% quando incubada a 37°C por 15 e 10 dias. Mas quando a temperatura é reduzida para 4°C, a bactéria sobrevive por mais de 100 dias em concentração entre 10,5% e 30,5% de sal (FRANCO; LANDGRAF, 2007). A escolha do meio de cultura mais adequado é

de fundamental importância para eficiência no isolamento e recuperação das estirpes de *Listeria* spp. (MANTILLA et al., 2008b).

A transmissão de *Listeria* spp. pode ocorrer tanto por contato direto quanto indireto com fontes contaminadas, por via oral, ocular, cutânea, respiratória e urogenital. No organismo pode estar presente em secreções oculares, nasais, em lesões purulentas da epiderme, na urina, nas fezes, no sangue, em placenta de bovino infectado e em outros tecidos contaminados. Porém, a transmissão por alimentos parece ser a forma mais importante, visto que espécies de *Listeria* têm sido isoladas de diferentes produtos, tais como leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus, e também de equipamentos e utensílios em plantas de processamento de carne bovina (BARROS et al., 2004; FRANCO; LANDGRAF, 2007; KOVACEVIC; MEKAC; ALLEN, 2012; MANTILLA et al., 2007; SORIANO et al., 2001; YUCEL; CITAK; ONDER, 2005). Estas bactérias estão envolvidas em grande número de surtos de origem alimentar por todo o mundo, e os alimentos mais incriminados são aqueles “prontos para consumo”, que são armazenados por longos períodos, principalmente os produtos cárneos (INGHAM et al., 2004).

Dentre as espécies do gênero, a *L. monocytogenes* é a mais patogênica para os humanos e causa doença cujos sintomas incluem septicemia, meningite, encefalite e infecção cervical ou intrauterina em gestantes, que podem provocar abortamento. Outros danos podem ocorrer como endocardite, abscessos, lesões cutâneas, além de sintomas semelhantes ao da gripe e gastrointestinais. A taxa de letalidade em recém-nascidos é de 30% e em adultos é de 35%. Porém quando ocorre septicemia a taxa de letalidade é de 50% e, com meningite, pode chegar a 70% (SILVA et al., 2010).

A espécie *L. monocytogenes* é considerada um patógeno emergente capaz de ocasionar doença através da ingestão de alimentos contaminados, principalmente, aqueles que não foram submetidos a tratamento térmico, como a carne bovina crua. Esta quando moída ou fatiada se torna um alimento que, além de possuir maior área de superfície e de ser altamente manuseado, possibilitando o crescimento bacteriano, permite o desenvolvimento de bactérias psicrófilas patogênicas como *Listeria* spp., por permanecerem estocados sob temperatura de refrigeração até o consumo (MANTILLA et al., 2007). Outro sério problema para saúde coletiva está na existência de estirpes patogênicas e resistentes aos

principais agentes antimicrobianos utilizados no tratamento da listeriose, dificultando o combate à infecção (MANTILLA et al., 2008a).

#### 4.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

Os agentes antimicrobianos são substâncias de origem biológicas e/ou sintéticas que produzem toxicidade seletiva sobre microrganismos (JAY, 2005). Tavares (2000) descreveu que a resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos nos microrganismos que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação de fármacos. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem no microrganismo durante seu processo reprodutivo e resultam de erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético. A outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, que ocorre através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em plasmídeos.

O desenvolvimento de resistência por certas bactérias é mais rápido que a capacidade da indústria em produzir novos fármacos e a disseminação de genes de resistência pode resultar no aumento da frequência de doenças que não podem ser tratadas com agentes antimicrobianos conhecidos (NAWAZ et al., 2001).

No Brasil, os estafilococos, tanto *S. aureus* como *S. epidermidis*, são resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina em mais de 70% das estirpes isoladas, seja em ambiente hospitalar ou na população em geral, não sendo mais indicado o uso destes antimicrobianos para o tratamento de infecções estafilocócicas, mesmo que benignas e mesmo que procedam do ambiente extra hospitalar (FARIAS et al. 1997; JAY, 2005; TAVARES, 2000).

O alimento também pode ser considerado um excelente meio para introdução de microrganismos resistentes em uma população, principalmente em imunodeprimidos, transferindo bactérias resistentes a antimicrobianos para o trato intestinal dos consumidores. E assim, no intestino, pode ocorrer a transferência de genes de resistência entre bactérias patogênicas e não patogênicas (SORUM; L'ABEE-LUND, 2002).

Com o aumento do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e até mesmo com fins terapêuticos na criação de animais de produção, existe o interesse global referente ao consumo de baixos níveis de resíduos em alimentos e os efeitos destes na saúde humana. A ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode ocasionar resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na terapêutica humana, dificultando o tratamento de enfermidades infecciosas. Em experimento realizado com estirpes de *Listeria* spp. isoladas a partir de amostras de carnes bovinas, observou-se que todas as estirpes isoladas foram resistentes à maioria dos antimicrobianos testados. As estirpes de *L. monocytogenes* foram resistentes à gentamicina, cefoxitina, ampicilina, clindamicina, oxaciclina e sulfazotrim (MANTILLA, et al., 2008a).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Controle Microbiológico e Controle Químico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia de Alimentos, da Faculdade de Veterinária, na Universidade Federal Fluminense. E a seguir constam o material e a metodologia utilizados no desenvolvimento do estudo.

### 5.1 MATERIAL PERMANENTE

O material permanente necessário para realização das análises estava disponível nos Laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense e está listado a seguir:

- ✓ Autoclave
- ✓ Balança analítica de precisão
- ✓ Banho-maria com agitador automático
- ✓ Bico de Bunsen
- ✓ Contador de colônias
- ✓ Deionizador
- ✓ Estufa bacteriológica
- ✓ Fogão
- ✓ Geladeira
- ✓ Homogeneizador tipo “Stomacher”
- ✓ Microscópio óptico
- ✓ pHmetro
- ✓ Pipeta automática (1mL)
- ✓ Termômetro tipo espeto

## 5.2 MATERIAL DE CONSUMO

Uma grande parte do material de consumo, como meios de cultura e reagentes, utilizado no estudo já se encontrava disponível para uso no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal. A outra parte foi adquirida através dos recursos financeiros disponibilizados para realização do estudo, proposto anteriormente no projeto de pesquisa.

## 5.3 MÉTODOS

### 5.3.1 Colheita, acondicionamento e transporte das amostras

As amostras de “carpaccio” foram obtidas aleatoriamente por meio de sorteio em 20 bares e 30 restaurantes do município de Niterói, no estado do Rio de Janeiro, nas condições oferecidas ao pronto consumo. É necessário ressaltar que a quantidade ofertada por cada estabelecimento variou entre si, porém foi suficiente para realização de cada análise de acordo com a legislação (BRASIL, 2003).

O estudo observacional foi delineado de modo transversal onde cada amostra correspondeu a um estabelecimento, que foi visitado apenas uma vez. E para o cálculo amostral foi utilizado o método de amostragem descrito por Di Giacomo e Koepsell (1986) e Martin, Meek e Willeberg (1987), conforme a prevalência previamente estimada de 15% com probabilidade de erro de 10%, encontrada em trabalhos de carne bovina moída anteriormente revisados, visto que não existem estudos com “carpaccio”. Desta forma, foram analisadas 50 amostras ao todo.

A aquisição foi realizada de forma semelhante a um consumidor comum e a temperatura do produto foi aferida com termômetro digital tipo espeto, previamente sanitizado com álcool a 70%. Em seguida, para a colheita foram utilizados utensílios também sanitizados e as amostras da carne, sem molhos e temperos, foram acondicionadas em embalagens estéreis (Bag Light® 001574) devidamente fechadas.

A identificação das amostras foi por etiquetas coladas nas embalagens, as quais continham informações sobre, data, hora, local da colheita, temperatura do produto, assim como a identificação numérica da amostra e outras observações julgadas necessárias.

As embalagens contendo as amostras foram acondicionadas em recipiente isotérmico contendo sachês de gelo em gel reutilizáveis, visando a manutenção da temperatura. Foram encaminhados ao Laboratório de Controle Microbiológico da Faculdade de Veterinária – UFF, onde permaneceram estocados a 4,0°C até a realização das análises bacteriológicas em no máximo 24 horas após a colheita, respeitando os limites propostos pelo "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods", que como regra geral para alimentos refrigerados, o transporte e estocagem devem ser entre 0 e 4,4°C e o intervalo máximo de 36 horas entre a colheita e análise (MIDURA; BRYANT, 2001).

### 5.3.2 Preparo das subamostras para processamento analítico

No interior da câmara asséptica, após a sanitização da bancada com álcool a 70%, exposição à luz ultra violeta por 15 minutos e lavagem e desinfecção das mãos, a embalagem contendo a amostra foi aberta com assepsia na zona de segurança da chama do Bico de Bunsen. Com auxílio de instrumentos flambados ao rubro e esfriados, foram retiradas as unidades analíticas para cada tipo de ensaio e pesadas em balança analítica (Martec® LC1).

Para o ensaio de presença e ausência de *Salmonella* spp., foram retirados 25 gramas da amostra e adicionados 225mL de Água Peptonada Tamponada (Himedia® M227), em embalagem estéril para homogeneização em "Stomacher" (Seward® 80) em velocidade normal, durante dois minutos. Para *Listeria* spp., o procedimento foi semelhante, sendo que foram adicionados 25 gramas de amostra em 225mL de Caldo Universidade de Vermont Modificado (UVM) (Difco® 222330) para posterior homogeneização.

Para o ensaios gerais de quantificação que compreenderam a contagem total de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas, contagem de coliformes totais e termotolerantes e contagem de

*Staphylococcus* coagulase positiva, foram retirados 25 gramas da amostra e adicionados em 225mL de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1%, em embalagem estéril para homogeneização em “stomacher” (Seward® 80) em velocidade normal, durante dois minutos, obtendo-se a diluição inicial  $10^{-1}$ . A partir da primeira diluição foram realizadas as diluições decimais seriadas, transferindo assepticamente 1mL da primeira diluição para 9mL do diluente SSP, de forma a obter as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  que serviram de inóculo para os diferentes meios de cultivo utilizados na pesquisa. O período entre o preparo da amostra e a inoculação nos meios não foi superior a 15 minutos.

### 5.3.3 Determinação do pH

A técnica empregada para determinação do pH foi o método potenciométrico, no qual a extremidade do eletrodo do pHmetro (Digimed® DM22), já ajustado com solução tampão, foi imersa na mistura de 50g da amostra triturada e homogeneizada com 10mL de água destilada (BRASIL, 1981). A leitura foi realizada em triplicata e em seguida calculada a média.

### 5.3.4 Análises bacteriológicas

Na Resolução nº12 (BRASIL, 2001), há a recomendação das seguintes análises bacteriológicas para pratos prontos para o consumo a base de carne crua, como o “carpaccio”: contagem de coliformes termotolerantes, contagem de estafilococos coagulase positiva e isolamento de *Salmonella* spp. Além dessas, foram realizadas a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM) e bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas (BHAP) em placas, como indicador geral de populações bacterianas, a contagem de coliformes totais, o isolamento e identificação de *Escherichia coli* e o isolamento e identificação de *Listeria* spp., tendo em vista sua importância em carne bovina.

#### 5.3.4.1 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas

O método analítico utilizado para contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (BHAM) é descrito na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003). E no método de contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas (BHAP) seguiu-se a recomendação da “American Public Health Association” (APHA), descrita no “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (COUSIN; JAY; VASAVADA, 2001).

Para a contagem de BHAM foram selecionadas as diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , onde 1mL de cada foi inoculado em placas de Petri descartáveis e esterilizadas seguido da adição de cerca de 15mL de Ágar Padrão para Contagem (APC) (Himedia® M091), previamente fundido e mantido a 44-46°C. Após a homogeneização do inóculo com o meio e sua solidificação, as placas foram incubadas invertidas em estufa (Thermolyne® 42000) a 35-37°C por 48 horas. As placas com 25 a 250 colônias foram selecionadas e as colônias contadas com auxílio de uma lupa, em um contador de colônias mecânico (Phvenix® CP602). O resultado foi obtido calculando o número de unidades formadoras de colônias por grama da amostra e multiplicando pelo inverso da diluição inoculada.

Para a contagem de BHAP foram selecionadas as diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , onde 0,1mL de cada foram inoculados na superfície de placas previamente preparadas com APC, utilizando uma alça de Drigalski para espalhar o inóculo até sua completa absorção. Em seguida, as placas foram incubadas a 7°C por 10 dias. A leitura foi realizada da mesma forma que para mesófilas, sendo que o resultado final foi multiplicado por dez, já que o volume inoculado foi dez vezes menor.

#### 5.3.4.2 Contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e isolamento, identificação e sorologia de *E. coli*

O método analítico utilizado está descrito na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

A partir das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , realizadas na etapa de preparo das subamostras, foi inoculado 1mL de cada em placas de Petri esterilizadas e em seguida adicionado cerca de 10mL de Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (Himedia® M049), previamente fundido e mantido a 44-46°C. Após a completa solidificação foi acrescentado a cada placa mais 10mL do meio para formação de dupla camada. A incubação foi realizada a 35-37°C por 18 a 24 horas.

O ágar cristal violeta vermelho neutro bile apresenta em sua composição sais biliares e cristal violeta, responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos, e vermelho neutro, um indicador de pH, que caracteriza a produção de ácido devido à fermentação da lactose pelos microrganismos presentes. Desta forma, após a incubação, foram selecionadas e contadas as placas que continham entre 15 e 150 colônias que apresentaram características típica de coliformes, ou seja, colônias róseas, rodeadas ou não por uma zona turva rosada devido ao precipitado de ácidos biliares resultantes da queda do pH. Em seguida, cinco colônias foram submetidas às provas confirmativas.

Para prova confirmativa de coliformes totais foi inoculada cada uma das colônias selecionadas em tubos contendo caldo bile verde brilhante 2% (Himedia® M121), que foram incubados a 35-37°C por 24 a 48 horas. A presença de coliformes totais foi confirmada pela formação de gás no interior do tubo de Durhan ou efervescência quando agitado delicadamente.

Para confirmação de coliformes termotolerantes foram inoculadas as mesmas colônias selecionadas em tubo contendo caldo EC (Fluka® 44653) e incubados a 45°C por 24 a 48 horas em banho-maria com agitação (Thermomix® BM). Da mesma forma, a presença de coliformes termotolerantes foi confirmada pela formação de gás ou efervescência também decorrente da fermentação da lactose.

O caldo bile verde brilhante 2% possui em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano, o verde brilhante, responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos. Já o caldo EC, além dos sais biliares, apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante impedindo a acidificação do meio. Assim, a presença de gás no interior dos tubos de Durhan evidencia a fermentação da lactose, presente nos meios citados, pelos coliformes.

O cálculo final das contagens de coliformes totais e termotolerantes foi obtido pelo número de colônias da contagem inicial multiplicado pelo fator de diluição, quando todas as colônias repicadas foram confirmadas.

Quando o número de colônias confirmadas foi diferente do número de repicadas, o resultado foi obtido através da fórmula abaixo:

$$= \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas} \times \text{n}^\circ \text{ de colônias confirmadas} \times \text{fator de diluição}}{\text{n}^\circ \text{ de colônias repicadas}}$$

Quando confirmada a presença de coliformes termotolerantes foi realizada a contagem de *E.coli*, seguindo os procedimentos propostos pelo “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

De cada tubo de EC com produção de gás foi estriada uma alçada em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (Himedia® M317), que foram incubadas a 35-37°C por 24 horas. E de cada placa incubada, foi retirada uma colônia típica, nucleada com centro preto, como ou sem brilho metálico, e transferida para Ágar Padrão para Contagem inclinado para purificação e incubada por mais 24 horas a 35-37°C (Figura 1).



**Fig. 1** Colônias típicas de *E. coli*, isoladas em Ágar Eosina Azul de Metileno, com centro preto e brilho verde metálico

A partir das culturas puras foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram e testes bioquímicos de produção de indol, motilidade, lisina descarboxilase, lisina deaminase, VM, VP e citrato.

\* Teste de motilidade, metabolização da lisina e produção de indol

A cultura foi inoculada com agulha em tubo contendo o meio Motilidade-Indol-Lisina (MILI) (Himedia® M847) e incubada a 35-37°C por 18-24 horas. A leitura da motilidade foi baseada no crescimento difuso típico de *E. coli*, apresentando turvação total do meio ou crescimento além da linha de inoculação. Com relação à metabolização do aminoácido lisina, quando há fermentação da glicose, ocorre troca de cor da base do meio para amarelo e com a descarboxilação da lisina, a cor do meio é revertida para púrpura. Deste modo, a coloração amarela na base do meio e púrpura no topo indica reação negativa para lisina descarboxilase. E as estirpes de *E. coli* são descarboxilase positiva. Por fim, para avaliação da produção de indol, foram adicionadas ao tubo três gotas do reagente de Kovacs, o qual detecta a formação do indol formado a partir do aminoácido triptofano presente no meio através de enterobactérias que possuem a enzima triptofanase. A reação foi considerada positiva após a formação de um anel vermelho na superfície do meio (Figura 2). As estirpes de *E. coli* podem ser indol positivas (típicas) ou negativas (atípicas).

\* Teste do VM

Em tubo contendo 3mL de caldo MR-VP (Himedia® M070), o cultivo foi inoculado com agulha e incubado a 35-37°C por 48 horas. O teste avalia a habilidade do microrganismo em produzir ácidos orgânicos relativamente estáveis, a partir da fermentação da glicose, de modo a superar a capacidade tamponante existente no meio. Após a incubação foram adicionadas três gotas de solução hidroalcoólica de vermelho de metila, que é um indicador do grau de acidez através de alterações de coloração. Com pH ácido o indicador alterou o meio para cor vermelha, caracterizando prova positiva (Figura 2). As estirpes de *E. coli* são VM positivas.

\* Teste do VP:

Em tubo contendo 3mL de caldo MR-VP (Himedia® M070), o cultivo foi inoculado com agulha e incubado a 35-37°C por 48 horas. O teste determina a habilidade do microrganismo em produzir a acetoina, a partir da fermentação do butilenoglicol, na qual as bactérias utilizam a glicose como substrato. Após a incubação foram adicionados 0,6mL de solução de  $\alpha$  naftol 5% e, em seguida, 0,2mL de solução de KOH 40%, agitando delicadamente. A acetoina é oxidada, na presença de oxigênio e álcali, produzindo o diacetil que reage com a creatina produzindo a coloração vermelha. O desenvolvimento da cor vermelha no meio indicou teste positivo e a permanência na cor amarela indicou teste negativo. As estirpes de *E. coli* são VP negativas (Figura 2).

\* Teste do citrato:

A cultura foi inoculada em tubo contendo Ágar Citrato Simmons (Himedia® M099S) e incubado 35-37°C por 24 horas. Quando a bactéria faz uso do citrato como fonte de carbono e os sais de amônio como fonte de nitrogênio o meio é alcalinizado e muda a coloração para azul, indicando teste positivo. Na permanência da verde indica teste negativo (Figura 2). As estirpes de *E. coli* são citrato negativas.



**Fig. 2** Provas bioquímicas de *E. coli* típicas representada, da esquerda para direita, por tubos indicando prova de indol positiva, VM positiva, VP negativa e citrato negativa

O resultado da contagem de *E.coli* foi obtido pela contagem de coliformes termotolerantes multiplicado pelo número de colônias confirmadas e dividido pelo número de colônias repicadas, como na fórmula abaixo:

$$= \frac{\text{n}^\circ \text{ de coliformes termotolerantes} \times \text{n}^\circ \text{ de colônias confirmadas}}{\text{n}^\circ \text{ de colônias repicadas}}$$

Após a caracterização bioquímica, as estirpes isoladas que apresentaram comportamento típico de *E.coli* foram submetidas à sorologia, através da técnica de aglutinação em lâmina, para identificação dos sorogrupos.

Para a realização do procedimento, obteve-se uma suspensão do cultivo bacteriano, semeado em Ágar Trypticase de Soja (Himedia® M290) e incubado a 35-37°C por 18 horas, com adição de 0,3mL de solução diluente. Procedeu-se a análise adicionando uma gota de soro a uma gota da suspensão em teste. Inicialmente foram utilizados os soros polivalentes da Probac do Brasil® para identificação de *E. coli* enteropatogênica clássica (Poli A, Poli B e Poli C), enteroinvasiva (Poli A e Poli B) e soro anti *E.coli* O157. Após homogeneização da mistura por dois minutos a ocorrência de aglutinação em um dos soros polivalentes determinava a realização do teste com os soros monovalentes correspondentes. Com a aglutinação em um dos soros monovalentes, considerava-se a cultura identificada.

Porém, a prova foi considerada negativa quando as culturas não aglutinaram nos soros polivalentes ou aglutinaram nos soros polivalentes, mas não aglutinaram nos monovalentes correspondentes ou quando a reação de aglutinação demorasse mais de dois minutos.



**Fig. 3** Prova da aglutinação em placa com resultado positivo para sorologia de *E.coli*

Após o isolamento e identificação, os cultivos em estoque foram testados quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, utilizando os discos da Polisensidisc® (4x6 DME), segundo Bauer et al. (1966).

#### 5.3.4.3 Contagem de Estafilococos coagulase positiva

O método analítico utilizado, a contagem direta em placas, está descrito na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Com as diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  preparadas anteriormente foi inoculado 0,1mL de cada diluição na superfície de placas contendo Ágar Baird-Parker (Himedia® M043) adicionado de emulsão de gema de ovo a 50% estéril e telurito de potássio, previamente preparadas e secas. O inóculo foi espalhado com um bastão tipo “hockey”, das placas de maior diluição para as de menor diluição, até que todo líquido fosse absorvido. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 35-37°C por 48 horas.

No meio Baird-Parker, verifica-se a habilidade do microrganismo de se multiplicar na presença de telurito de potássio combinado com lítio e glicina. *Staphylococcus* spp. reduz o telurito de potássio produzindo colônias pretas. A suplementação do meio com gema de ovo possibilita a verificação da atividade lipolítica e proteolítica através da formação de um halo de transparência e precipitação ao redor das colônias. Desta forma foram selecionadas e contadas as placas com 20 a 200 colônias circulares, pretas ou cinzas escuras, lisas, rodeadas por uma zona opaca e um halo transparente, consideradas como típicas.

Para confirmação das colônias típicas, foram selecionadas cinco colônias de cada placa e cada colônia foi repicada com auxílio de agulha de platina em tubo contendo Caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) (Himedia® M210) e tubo contendo Ágar BHI (Oxoid® CM0375) inclinado. Ambos foram incubados a 35-37° por 24 horas.

Após a incubação foi retirada uma alíquota para realização do esfregaço em lâmina, corada pelo método de Gram, para observação das características morfotintoriais do microrganismo ao microscópio óptico através da bacterioscopia de

imersão. As culturas que continham cocos Gram positivos foram inoculadas para os testes confirmativos da catalase e coagulase.

Para a prova da catalase foram adicionadas três gotas de peróxido de hidrogênio a 3% no tubo contendo Ágar BHI inclinado, anteriormente incubado. Nos casos positivos foi verificada a formação de bolhas ou efervescência que indica a decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase, liberando oxigênio. As estirpes de *Staphylococcus* spp. são catalase positiva (Figura 4).

Para a prova da coagulase foram transferidos 0,2mL da cultura obtida após incubação do caldo BHI, para um tubo estéril de 10x100mm e adicionados 0,2mL de Plasma de Coelho Liofilizado (NewProve® 1019) já diluído em solução fisiológica estéril, conforme recomendação do fabricante. Após a homogeneização o tubo foi incubado a 35-37°C por 24 horas. A coagulação de toda ou da maior parte do conteúdo do tubo foi considerada reação positiva, confirmando a presença de estafilococos coagulase positiva (Figura 4).



**Fig. 4** Testes confirmativos para estafilococos coagulase positivo. À esquerda prova da catalase positiva, com formação de bolhas. À direita prova da coagulase positiva com a formação de coágulos no fundo dos tubos

O cálculo do resultado final foi obtido pelo número de colônias da contagem inicial, multiplicando pelo fator de diluição e pelo fator de correção, quando todas as colônias repicadas fossem confirmadas.

Quando o número de colônias confirmadas foi diferente do número de repicadas, o resultado foi obtido através da fórmula abaixo:

$$= \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas} \times \text{n}^\circ \text{ de colônias confirmadas} \times \text{fator de diluição} \times \text{fator de correção}}{\text{n}^\circ \text{ de colônias repicadas}}$$

Após a confirmação, os cultivos de estafilococos coagulase positiva, foram testados quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, utilizando os discos da Polisensidisc®, conforme Bauer et al (1966).

#### 5.3.4.4 Isolamento, identificação e sorologia de *Salmonella* spp.

A técnica utilizada é descrita pela Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

A amostra previamente preparada foi incubada a 35-37°C por 20 horas, objetivando a recuperação das células injuriadas. Após a incubação foram retiradas alíquotas de 0,1mL para inoculação em tubos contendo 10mL de caldo Rappaport Vassiliadis (Himedia® M880) e 1mL para inoculação em tubos contendo 10mL de caldo selenito cistina (Himedia® M1079). Os tubos foram incubados a 41 ± 0,5°C em banho maria por 24 a 30 horas.

No caldo Rappaport Vassiliadis, a presença de verde malaquita e de cloreto de magnésio, associada à temperatura de 41 ± 0,5°C, atua como agentes seletivos da microbiota acompanhante, enquanto que a presença de peptona de farinha de soja estimula o crescimento de *Salmonella*. No caldo selenito-cistina, o agente inibidor selenito de sódio atua inibindo os coliformes e enterococos.

A partir dos caldos seletivos de enriquecimento, foram repicados através de estriamento sobre a superfície de placas contendo três meios seletivos diferentes, Ágar Verde Brilhante (Vetec® 5054), Ágar *Salmonella* Diferencial (Himedia® M1078) e Ágar Hektoen (Himedia® M467). As placas foram incubadas invertidas a 35-37° por 18 a 24 horas. Esta etapa consiste no plaqueamento seletivo e objetiva

promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella* spp., para posterior confirmação bioquímica.

No Ágar verde brilhante o extrato de levedura e duas peptonas fornecem os nutrientes; a lactose e a sacarose, juntamente com o vermelho de fenol, fornecem um sistema de diferenciação entre os fermentadores da lactose e/ou sacarose e as salmonelas visto que não produzem ácidos a partir destes açúcares. O verde brilhante é o agente seletivo que inibe a microbiota Gram positiva acompanhante.

O Ágar *Salmonella* Diferencial é um substrato nutritivo que possui em sua formulação o desoxicolato de sódio, propilenoglicol e cromógeno. A capacidade do gênero *Salmonella* de formar ácido a partir do propilenoglicol é evidenciada para diferenciá-lo de outras enterobacteriáceas. Desta forma, as colônias suspeitas de *Salmonella* spp. são avermelhadas em função da produção de ácido apontada pelo indicador de pH. Já as colônias suspeitas de coliformes se apresentam azuis esverdeadas ou roxas azuladas.

O Ágar Hektoen é um meio moderadamente seletivo para *Salmonella* spp. que possui sais biliares, inibindo os microrganismos Gram-positivos e reduzindo o crescimento de alguns Gram-negativos. Possui em sua formulação a lactose, a sacarose e a salicina que proporcionam uma diferenciação entre a cor das colônias e a do meio. Porém, as espécies de *Salmonella* não fermentam estes compostos de carbono e, conseqüentemente, não provocam alteração da cor do sistema de indicação do pH, cujo indicador é o azul de bromotimol. Além disso, devido à combinação de tiosulfato de sódio com citrato de amônio férrico, as colônias podem produzir H<sub>2</sub>S formando centros pretos.

Para cada amostra foram selecionadas três colônias típicas de *Salmonella* spp. de cada meio de plaqueamento seletivo para repique em tubos contendo APC, para purificação e incubação a 35-37°C por 24 horas. Em seguida, foram submetidas às provas de triagem para verificação do perfil característico das estirpes de *Salmonella* spp. e diferenciação das estirpes de *Proteus* spp.

#### \* Reação em Ágar “Triple Sugar Iron” (TSI)

Com auxílio de agulha, as estirpes foram inoculadas em tubo contendo Ágar “Triple Sugar Iron” (TSI) (Himedia® M021) inclinado, por picada e estriamento na superfície. Em seguida, foram incubados a 35-37°C por 24 horas.

A reação típica de *Salmonella* spp. ocorre quando o bisel do meio estiver vermelho, caracterizando alcalinização pelo indicador vermelho de fenol; fundo amarelo, indicativo de meio ácido por fermentação da glicose; com ou sem produção de gás; e com ou sem produção de gás sulfídrico na fase intermediária do tubo (Figura 5).

\* Descarboxilação da lisina

Com auxílio de agulha, cada cultura foi inoculada em tubo inclinado de Ágar “Lisine Iron Agar” (LIA) (Himedia® M377), por picada profunda e estriamento na superfície. Em seguida, incubadas a 35-37°C por 24 horas.

No Ágar LIA, em um primeiro momento, ocorre acidificação do meio pela fermentação da glicose com viragem do indicador púrpura de bromo cresol para amarelo. Posteriormente ocorre a descarboxilação da lisina resultando na produção da cadaverina e dióxido de carbono que conferem alcalinidade ao meio e viragem do indicador para violeta, resultando em teste positivo. A maioria das salmonelas é capaz de produzir lisina descarboxilase (Figura 5).



**Fig. 5** Provas de triagem para *Salmonella* spp. À esquerda prova da descarboxilação da lisina positiva e à direita reação típica em Ágar TSI

#### \* Comportamento no meio Motilidade Indol Sulfito (SIM)

Cada cultura foi inoculada em tubos contendo Ágar SIM (Fluka® 85438) através de picada profunda e incubadas a 35-37°C por 24 horas.

No meio SIM é observado a motilidade característica da maioria das salmonelas, através da difusão do crescimento por todo o meio. Favorece também a verificação da produção de sulfito de hidrogênio, o qual reage com o citrato de ferro e amônio, formando um precipitado preto insolúvel.

Para verificar a produção de indol foram adicionadas duas gotas de Reativo de Kovac's, o qual detecta a formação do indol formado a partir do aminoácido triptofano presente no meio através de enterobactérias que possuem a enzima triptofanase, resultando na formação de um anel vermelho na superfície do meio. Quase a totalidade das salmonelas não produz indol (Figura 6).

#### \* Desaminação da fenilalanina

Cada cultura foi inoculada com auxílio de agulha em um tubo inclinado de Ágar fenilalanina (Vetec® 5022), por estriamento na superfície e incubadas a 35-37°C por 24 horas.

Esta prova foi utilizada para diferenciar o comportamento de estirpes de *Salmonella* spp. de estirpes de *Proteus* spp. E para isso, após a incubação, foi realizada a leitura com gotejamento de cloreto férrico a 10%, que reage com o ácido fenilpirúvico formado pela desaminação do aminoácido fenilalanina, formando um composto verde na superfície. Diferentemente das espécies de *Proteus*, as espécies de *Salmonella* não desaminam a fenilalanina e, portanto, a prova é negativa (Figura 6).



**Fig. 6** Provas de triagem para *Salmonella* spp. À esquerda o comportamento em meio SIM, sendo o primeiro tubo característico de *Salmonella* spp. À direita a prova da desaminação da fenilalanina

As estirpes que apresentaram reações típicas de salmonela nas provas de triagem foram submetidas à confirmação sorológica, sendo repicadas em ágar estoque inclinado e incubadas a 35-37°C por 24 horas para posteriormente serem adicionadas de 2mL de solução salina 0,85% para formação de uma suspensão (BRASIL, 2003). Em lâmina de vidro, foi depositado separadamente uma gota de solução salina 0,85% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente "O" (Probac do Brasil®). Em seguida, a cada uma, foi acrescentada uma gota da suspensão em teste realizando movimentos circulares para movimentar a emulsão, por cerca de um minuto. Foi considerada como reação positiva a presença de aglutinação somente na mistura cultivo e anti soro, certificando que o soro utilizado não tinha capacidade auto aglutinante.

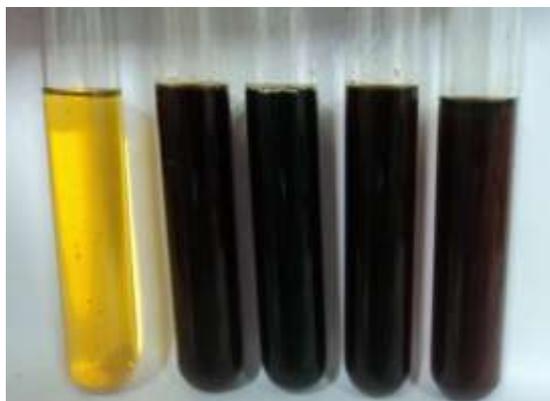
Após o isolamento e identificação, os cultivos em estoque foram testados quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, utilizando os discos da Polisensidisc®, segundo Bauer et al. (1966).

#### 5.3.4.5 Isolamento e identificação de *Listeria* spp.

O método analítico utilizado é descrito pela Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003), sendo que foram empregados dois meios alternativos para plaqueamento seletivo de *Listeria* spp.

A amostra previamente preparada, adicionada do UVM e cominuída foi incubada em estufa a 30°C por 24 horas. Esta etapa consiste no enriquecimento seletivo primário. Após a incubação, foi transferido 0,1mL da cultura para tubo contendo 10mL de caldo Fraser (Acumedia® 7502A) adicionado de 0,1mL do suplemento SR156 (Oxoid® X4196B) e incubado a 30°C por 48 horas. Esta etapa consiste no enriquecimento seletivo secundário. Ambas têm a finalidade de inibir a microbiota acompanhante, permitindo a recuperação de microrganismos do gênero *Listeria*. O efeito seletivo no caldo UVM é exercido pela associação de ácido nalidíxico e acriflavina e no caldo Fraser pelo cloreto de lítio, ácido nalidíxico e acriflavina.

Após incubação do caldo Fraser foi verificada a ocorrência do escurecimento do meio, devido à hidrólise da esculina. Nos casos positivos, os inóculos foram semeados em meios para plaqueamento diferencial, e nos casos negativos, as amostras foram descartadas (Figura 7).



**Fig. 7** Incubação em caldo Fraser. À esquerda tubo controle e demais tubos escurecidos devido à hidrólise da esculina

Utilizando a alça de platina foi repicado de cada caldo Fraser positivo para placas contendo três diferentes meios, o Ágar Triptose (Himedia® M177) suplementado com ácido nalidíxico (ATN), o Ágar Oxford (Himedia® M1145) adicionado do suplemento SR140E (Oxoid® X3813B) e o Mc Bride Listeria Agar (MMA) (Bacto® 0922176) suplementado com cicloheximide, e incubadas a 30°C por 48 horas.

A substância seletiva presente no meio ATN é o antimicrobiano ácido nalidíxico, que atua inibindo a síntese de DNA bacteriano, principalmente de bacilos Gram negativos. No ágar Oxford, o cloreto de lítio, sulfato de colistina, cefazolina, cicloheximide e fosfomicina são as substâncias responsáveis pela supressão da multiplicação da microbiota acompanhante, como cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos. No MMA, o cloreto de lítio, feniletanol e ciclohexidine também desempenham esta função.

Foram selecionadas três colônias típicas de cada meio, azul acinzentada no ATN, enegrecidas rodeadas por halo preto no Ágar Oxford e branco iridescente a azul claro em MMA. Estas foram repicadas em ágar estoque inclinado e incubadas a 30°C por 24 horas, para posterior confirmação das colônias.

A confirmação bioquímica de *Listeria* spp. realiza-se por meio da verificação da produção de catalase, observação das características morfotintoriais, verificação do crescimento típico em meio semi-sólido e, adicionalmente, por meio da verificação da incapacidade de redução de nitrato e verificação da positividade nas reações de Vermelho de Metila e Voges Proskauer (VM-VP).

\* Prova da catalase e características morfotintoriais:

Em uma lâmina de vidro foi depositada uma gota de peróxido de hidrogênio 3% e, com auxílio de alça de platina, uma alíquota do cultivo, homogeneizando com a gota do reagente. A presença de catalase foi verificada por desprendimento de borbulhas de oxigênio.

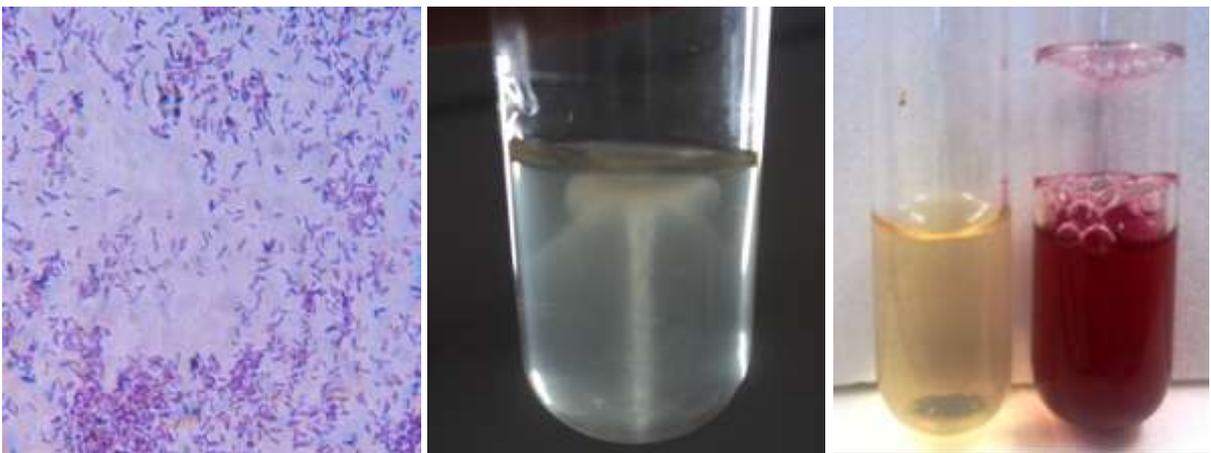
Das culturas catalase positivas, foram realizados esfregaços para coloração pelo método de Gram, onde se verificava a presença de bastonetes curtos Gram positivos, característicos de *Listeria* spp. (Figura 8).

\* Prova da motilidade:

A alíquota da cultura do ágar estoque foi semeada em Ágar Motilidade para *Listeria* (Difco® 0105175), com agulha por picada e incubado a 30°C por 48 horas. Após incubação, foi verificado o típico crescimento móvel em forma de guarda-chuva (Figura 8).

\* Prova de Redução de Nitrato:

Em tubos contendo caldo nitrado (Merck® 10204) foram inoculadas as alíquotas suspeitas e incubados a 30°C por 24 horas. Em seguida foram adicionadas a cada tubo três gotas de alfa-naftilamina 0,5% e três gotas de ácido sulfanílico a 0,8%. O aparecimento de coloração rosa indicou positividade. Quando não houve desenvolvimento de coloração, foi adicionado ao meio algumas miligramas de pó de zinco, visando realizar a redução do nitrato quimicamente. Nesse caso, o aparecimento de coloração rosa indicou reação negativa e a não alteração de cor indicou positividade. As culturas de *Listeria* spp. não reduzem o nitrato (Figura 8).



**Fig. 8** Confirmação bioquímica de *Listeria* spp. À esquerda esfregaço constando bastonetes Gram positivos. Ao meio crescimento móvel em forma de guarda-chuva. À direita prova de redução de nitrato, com tubo negativo e tubo positivo induzido quimicamente

\* Prova de VM-VP:

Cada cultura suspeita foi inoculada em dois tubos contendo caldo MR-VP e incubadas a 35-37°C por 5 dias. Após a incubação, em um tubo foi adicionado três gotas de solução de vermelho de metila a 0,06%. O aparecimento da cor vermelha indica reação VM positiva. No outro tubo foram adicionados 0,6 mL de alfa-naftol solução alcoólica 5% e 0,2 mL de hidróxido de potássio solução aquosa 40%, agitando. Após o repouso por uma hora, o aparecimento da cor vermelha escura indicou reação VP positiva. As culturas de *Listeria* spp. apresentam reações VM e VP positivas.

As culturas que tenham confirmado as características do gênero *Listeria* foram submetidas a testes para diferenciação entre *Listeria monocytogenes* e outras espécies por meio das seguintes provas bioquímicas:

\* Produção de alfa-hemólise:

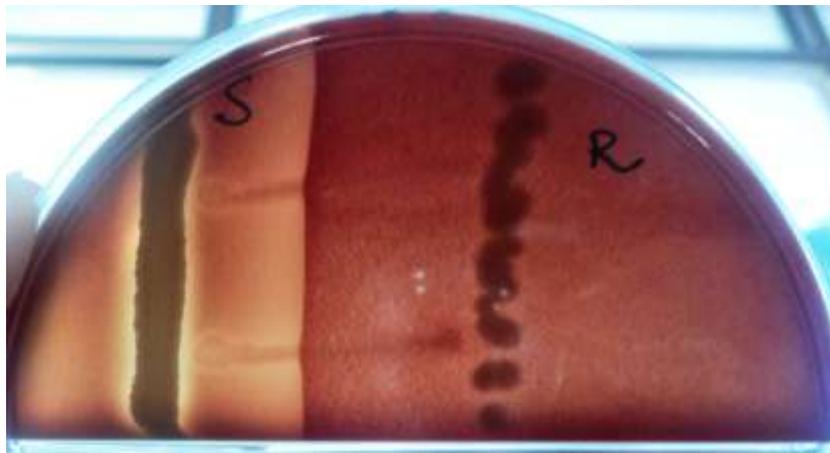
Sobre a superfície seca de Ágar Sangue (Himedia® M1301) desfibrinado de carneiro, foi estriado o inóculo com alça e incubado a 35-37°C por 48 horas. A reação positiva se traduziu pelo aparecimento de zona clara transparente ao redor das colônias. As culturas de *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* e *Listeria seeligeri* são alfa-hemolíticas.

\* CAMP teste:

Em Ágar Trypticase de Soja (Himedia® M290) com 0,6% de extrato de levedura (Vetec® 3033) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro e com auxílio de agulha, foram traçadas duas linhas verticais, paralelas e opostas, uma com a estirpe *Staphylococcus aureus* beta-hemolítico (ATCC 25923) e outra de *Rhodococcus equi* (ATCC 6939). No espaço entre as estrias, inoculou-se uma única estria de cada cultura suspeita, perpendicularmente. As placas foram incubadas a 35-37°C por 72 horas e em seguida foram examinadas quanto à presença de hemólise na zona de interação, próximo às linhas verticais. A atividade hemolítica de *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* se apresenta aumentada próximo à linha de crescimento de *S. aureus*.

As demais espécies apresentam reação de CAMP negativa com o *S. aureus*. A reação de CAMP produzida por *L. ivanovii* com *R. equi* se caracteriza por ser mais intensa e se apresentar em forma de flecha. *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* são não hemolíticas e não apresentam reação de CAMP positiva com *S. aureus* e *R. equi*.

Deve ser ressaltado que a maioria dos isolados de *L. monocytogenes* produz também uma zona de intensificação da hemólise junto à linha de crescimento de *R. equi*.



**Fig. 9** CAMP teste. S (*S. aureus* beta-hemolítico) e R (*R. equi*). Reação positiva próxima à linha S, com atividade hemolítica, e negativa próxima à linha R

\* Fermentação de carboidratos:

Utilizou-se nesta prova o caldo vermelho de fenol base, elaborado no laboratório, a partir dos seguintes ingredientes: 10g de peptona, 1g de extrato de carne, 5g de cloreto de sódio e 0,018g de vermelho de fenol para um litro de água deionizada (BRASIL, 2003). Foram adicionados separadamente os carboidratos xilose, manitol e ramnose, na concentração final de 1%. O meio completo com cada um dos carboidratos foram distribuídos em tubos no volume de 3mL e, em seguida, os tubos contendo manitol foram esterilizados a 121°C por 15 minutos e os tubos contendo xilose e ramnose, a 121°C por 10 minutos.

As culturas suspeitas foram inoculadas nos três tubos adicionados respectivamente de xilose, manitol e ramnose e incubado a 30°C por 36 horas. A

viragem de cor do indicador vermelho de fenol para amarelo indica a fermentação do açúcar presente.

As reações típicas das diversas *Listeria* sp. estão representadas na figura abaixo.

	LM	LIVA	LINN	LW	LS	LG
â-hemólise	+	+	-	-	+	-
Red-NO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-
CAMP Teste-SA	+	-	-	-	+	-
CAMP Teste-RE	V	+	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	+
Ramnose	+	-	V	V	-	-
Xilose	-	+	-	+	+	-
VM	+	+	+	+	+	+
Gram	+	+	+	+	+	+

V= variável AS = *S.aureus* RE = *R.equi*

LM = *L. monocytogenes*; LIVA = *L. ivanovii*; LINN = *L. innocua*; LW = *L. welshimeri*;

LS = *L. seeligeri*; LG = *L. grayi*

**Quadro 1** Representação das reações bioquímicas das diferentes *Listeria* spp. (BRASIL, 2003)

Após identificação, as culturas foram testadas quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, utilizando os discos da Polisensidisc®, segundo Bauer et al. (1966).

### 5.3.5 Teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos

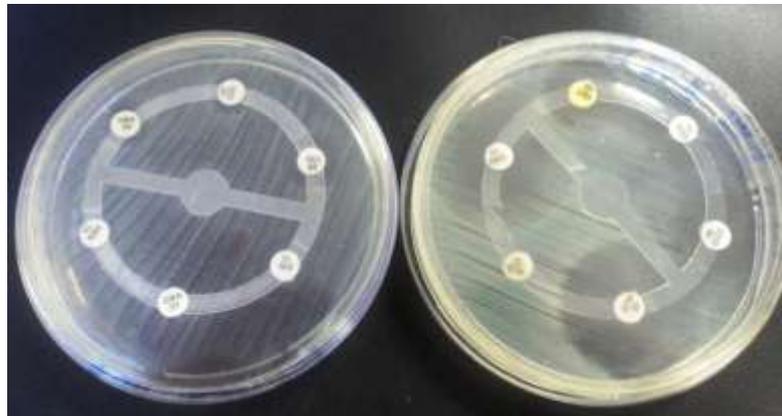
As estirpes isoladas em estoque foram mantidas em temperatura ambiente durante 30 minutos, sendo em seguida semeadas em APC e incubadas a 35-37°C por 24 horas. A partir dos subcultivos crescidos foi adicionada água destilada esterilizada, emulsionando para produzir uma suspensão com turvação igual ao padrão número um da escala de Mc Farland: 1 mL de cloreto de bário a 1% com 99 mL de ácido sulfúrico a 1%, que corresponde a  $3,8 \times 10^8$  microrganismos por mililitro.

As placas contendo Ágar Mueller Hilton (Merck® 105437) foram retiradas da geladeira e mantidas em temperatura ambiente para posterior semeadura utilizando suabe esterilizado embebido no inóculo, sendo espalhado homoganeamente na superfície do meio. Após a absorção do inóculo por alguns minutos, foram colocados

os discos (Polisensidisc® 4x6 DME) utilizando pinça previamente flambada e esfriada. Em seguida as placas foram incubadas a 35-37°C por 24 horas, conforme descrito na metodologia de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966).

No caso de microrganismos Gram negativos como *E.coli* e *Salmonella* spp. foram utilizados o módulos III, que contempla os antibacterianos amicacina, ampicilina, cefalotina, cefotaxima, ceftadizima, sulfazotrin, e o módulo IV que possui aztreonam, cefoxitina, ceftriaxona, gentamicina, cloranfenicol e tetraciclina. Para Gram positivos, como o *S. aureus* e *Listeria* spp., foram utilizados o módulos I, composto por clindamicina, eritromicina, oxacilina, penicilina G, teicoplanina e vancomicina, e o módulo IV, descrito anteriormente.

A leitura dos resultados de sensibilidade foi realizada medindo o tamanho das zonas de inibição de crescimento bacteriano com um halômetro, sendo a estirpe bacteriana classificada como resistente, intermediária, moderadamente sensível e sensível, de acordo com o diâmetro da zona padrão estabelecida na tabela fornecida pelo laboratório fabricante dos antimicrobianos.



**Fig. 10** Teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. A placa à esquerda é característica de resistência aos antimicrobianos testados, sem formação de halo de inibição. A placa à direita apresenta halos de inibição do inóculo frente a alguns antimicrobianos

#### 5.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os dados e resultados foram avaliados através do programa SPSS Statistics 17 (Windows & Mac), onde as análises estatísticas das contagens de BHAM, BHAP, coliformes totais, termotolerantes, *E. coli* e estafilococos coagulase positiva por estabelecimento, assim como a análise de pH e temperatura, foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para análise da proporção de amostras fora dos padrões, nos grupos bar e restaurante, para coliformes termotolerantes, *E. coli*, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp., foi utilizado o Fisher's Exact Test.

A comparação dos meios utilizados na determinação da positividade para *Salmonella* spp. e para *Listeria* spp. foi realizada utilizando o teste de McNemar. E, por fim, a determinação de associação entre variáveis quantitativas foi avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson. Em todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado durante a realização deste estudo que o “carpaccio” de carne bovina é um prato bastante comum servido em bares e restaurantes do município de Niterói, consumido como aperitivo ou entrada, e se apresentou como um alimento caro, variando na média de 18,75 reais/100g.

Tendo em vista a necessidade do conhecimento sobre sua qualidade higiênico sanitária, serão apresentados a seguir os resultados das análises realizadas, de acordo com o microrganismo envolvido.

### 6.1 BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS PSICROTÓFICAS

Os resultados referentes às contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (BHAM) e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas (BHAP) realizadas a partir de amostras de “carpaccio” comercializados em bares e restaurantes estão inseridos na Tabela 1.

**TABELA 1** - Resultado das contagens de BHAM e BHAP realizadas em “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes

Análises	Estabelecimentos	
	Bares	Restaurantes
BHAM	5,22 ± 1,10 <sup>a</sup>	5,68 ± 1,15
(log UFC/g)	(3,83 – 7,41) <sup>b</sup>	(3,30 – 7,73)
BHAP	4,59 ± 1,12	4,69 ± 1,21
(log UFC/g)	(3,11 – 6,03)	(2,48 – 7,15)

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão

<sup>b</sup> Valor mínimo – máximo

Observou-se que, independente do tipo de estabelecimento, as médias dos resultados das contagens de BHAM foram maiores que de BHAP tendo como valor máximo encontrado 7,73 log UFC/g. Porém, embora tenha tido uma média inferior, nas análises de psicrotróficas observou-se a presença em grande quantidade destas bactérias nas amostras, alcançando o valor máximo de 7,15 log UFC/g.

Apesar da ausência de um padrão máximo de contagens de BHAM e BHAP estabelecidos na legislação brasileira, existem especificações relativas à contagem máxima a nível internacional, padronizada pelo “International Commission On Microbiological Specifications For Foods” (1986), que utiliza como referência limite o valor de 7,00 log UFC/g. Desta forma, utilizando este parâmetro, 13% de todas as amostras avaliadas estavam acima do padrão para BHAM e 2,2% para BHAP, indicando baixa qualidade do produto podendo estar relacionada com grau de deterioração, deficiências na sanitização, falha do controle do processo ou de matérias primas.

Na literatura não há estudos que comparem resultados de contagens de BHAM e contagens de BHAP em carne bovina fatiada, porém existem diversos experimentos semelhantes que utilizaram carne bovina moída. A maioria dos autores estabelecem altas médias de contagens de BHAM como 7,48 log UFC/g encontradas por Lundgren et al. (2009); 6,72 log UFC/g por Julião e Costa (2002) e 6,17 log UFC/g por Motta e Belmont (2000). Neste último foi determinado ainda, assim como no presente estudo, que em 13% das amostras foram encontradas contagens acima de 7,00 log UFC/g. Com estes resultados verifica-se a péssima qualidade da carne bovina ofertada aos consumidores.

Estabelecendo uma comparação entre resultados das contagens em bares e restaurantes, observou-se que não houve diferença estatística, ao nível de 5% de significância, entre as contagens de BHAM ( $p=0,153$ ) e BHAP ( $p=0,812$ ). E ao realizar a análise de correlação linear de Pearson, verificou-se que apesar da correlação negativa ( $r<0,600$ ) entre os resultados de BHAM e BHAP ( $r=0,516$ ), a proximidade dos valores dá indícios de correlação, sendo necessário número superior de amostras para avaliação correta da relação.

6.2 COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *E. coli*

Os resultados referentes às contagens de coliformes totais, termotolerantes e *E.coli* realizadas a partir de amostras de “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes estão descritos na Tabela 2.

**TABELA 2** - Resultado das contagens de coliformes totais, termotolerantes e *E.coli* realizadas em “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes

Análises	Estabelecimentos	
	Bares	Restaurantes
Coliformes totais (log UFC/g)	3,42 ± 1,14 <sup>a</sup> (1,00 – 5,40) <sup>b</sup>	3,13 ± 1,24 (0,00 – 5,83)
Coliformes termotolerantes (log UFC/g)	1,25 ± 1,72 (0,00 – 4,70)	1,52 ± 1,49 (0,00 – 4,61)
<i>E. coli</i> (log UFC/g)	0,14 ± 0,38 (0,00 – 1,75)	0,51 ± 0,95 (0,00 – 3,04)

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão

<sup>b</sup> Valor mínimo – máximo

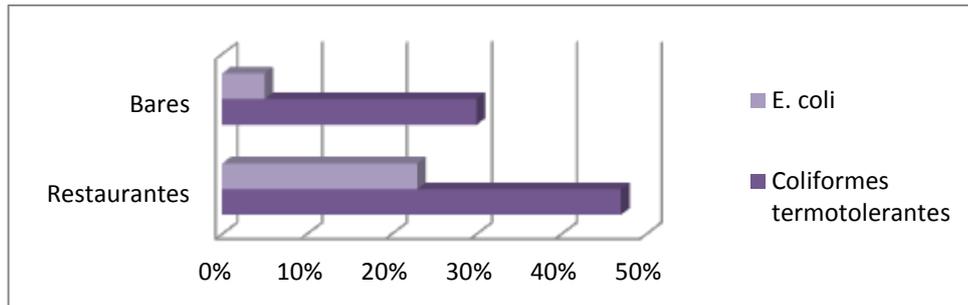
Analisando os resultados de coliformes totais, notam-se as altas médias encontradas, chegando ao valor máximo de 5,83 log UFC/g. Apesar da ausência de padrão em legislação brasileira, contagens elevadas de coliformes totais são indicativas de más condições de higiene nos processos de manipulação, visto que são microrganismos facilmente inativados pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a higienização é falha. E ao realizar a correlação linear, verificou-se que houve correlação positiva ( $r \geq 0,600$ ) entre as contagens de coliformes totais com BHAM ( $r=0,611$ ) e com BHAP ( $r=0,885$ ). Tal resultado pode ser explicado por Holt et al. (1994a) tendo em vista que diversas espécies pertencem ao grupo os coliformes, dentre as quais se destacam bactérias originárias do trato gastrointestinal e também bactérias não entéricas, as quais se multiplicam em uma faixa ampla de temperatura, enquadrando-se como mesófilas ou psicotróficas.

Ebone, Cavalli e Lopes (2011) ao pesquisarem sobre a segurança e a qualidade higiênico sanitária de unidades de produção de refeições, verificaram que muitos dos estabelecimentos não utilizavam as boas práticas de manipulação nem a análise de perigos e pontos críticos de controle, impossibilitando a garantia da produção de alimentos seguros e colocando em risco a saúde do consumidor.

Também foram encontrados altos valores nas contagens de coliformes termotolerantes, variando de estabelecimento com ausência até locais cujo valor chegou a 4,70 log UFC/g. No padrão fixado para coliformes termotolerantes, através da RDC nº12 para “carpaccio”, é estabelecido o valor máximo de  $10^2$  UFC/g, ou seja, 2,00 log UFC/g (BRASIL, 2001). Com base neste parâmetro, observou-se que 30% dos bares e 47% dos restaurantes não estavam em conformidade com a legislação, apresentando altas contagens, reforçando os indícios de condições higiênicas insatisfatórias e falhas no processo de produção (Figura 11). Apesar das elevadas contagens de coliformes totais e termotolerantes encontradas, estas não podem ser diretamente relacionadas com contaminação fecal, visto que, conforme Silva et al. (2010), tais microrganismos não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente, e podem ser encontrados em ambientes de manufatura de alimentos, se tornando parte da microbiota residente.

Analisando as contagens de *E. coli*, observou-se a sua presença em 5% das amostras coletadas em bares e 23% em restaurantes (Figura 11), variando entre a sua ausência até o valor de 3,04 log UFC/g. Também para *E. coli* não há padrão fixado em legislação brasileira, porém, a sua presença no alimento é indicativo de contaminação fecal, principalmente em alimentos *in natura*.

Cetinkaya et al. (2012), analisando a qualidade microbiológica de um prato a base de carne crua conhecido como “cig kofte”, verificaram uma média de coliformes de 3,46 log UFC/g e 2,41 log UFC/g de *E.coli*. Desta forma, salientaram a importância da atenção durante a fabricação, principalmente de produtos cárneos crus, na prevenção da disseminação de agentes patogênicos de origem fecal.



**Fig. 11** Frequência de estabelecimentos em não conformidade com padrões fixados para contagens de coliformes termotolerantes e presença de *E. coli*

Considerando a análise estatística de comparação entre as contagens de coliformes totais ( $p=0,395$ ), coliformes termotolerantes ( $p=0,518$ ) e *E. coli* ( $p=0,850$ ), não houve diferença significativa entre bares e restaurantes em nenhuma das contagens realizadas. E, com base no teste Fisher's Exact, ao avaliar as frequências de não conformidade de coliformes termotolerantes ( $p=0,377$ ) e *E. coli* ( $p=0,123$ ) entre bares e restaurantes, também não houve diferença estatística significativa.

De todas as amostras confirmadas com presença de *E. coli* foram isoladas nove colônias típicas para realização do teste de sorologia para avaliação da patogenicidade. Conforme a Tabela 3, verifica-se que das nove colônias típicas, sete foram consideradas com típicas e patogênicas, sendo a maioria (75%) proveniente de restaurantes. Observa-se ainda, que após o procedimento sorológico, as estirpes do grupo EHEC foram as mais frequentemente encontradas (57,1%), seguida do grupo EPEC (42,9%). Não foram sorotipadas estirpes pertencentes ao grupo EIEC.

Na aglutinação dos soros monovalentes, o sorogrupo mais encontrado foi EHEC O157, com quatro colônias positivas, seguido de EPEC PoliA 026, EPEC PoliA O55 e EPEC Poli B O158, cada um com uma colônia positiva cada (Tabela 4).

**TABELA 3** - Classificação de colônias típicas de *E. coli* patogênicas isoladas de “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes

	Total de colônias típicas	Nº de colônias sorotipadas			Total de colônias típicas patogênicas
		EPEC	EHEC	EIEC	
Bares	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
Restaurantes	8	3 (37,5%)	3 (37,5%)	0 (0%)	6 (75%)
Total	9	3 (42,9%)	4 (57,1)	0 (0%)	7 (77,8%)

**TABELA 4** - Sorogrupos indicadores de *E. coli* patogênicas isoladas de “carpaccios” comercializado em bares e restaurantes

	Sorogrupos								
	EPEC A				EPEC B				EHEC
	O26	O55	O111	O119	O114	O125	O142	O158	O157
Bares	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Restaurantes	1	1	0	0	0	0	0	1	3
Total	2				1				4

Apesar de não haver no país registros epidemiológicos de surtos envolvendo o grupo EHEC, pesquisadores apontam em seus estudos que grande parte do rebanho brasileiro é portador do microrganismo no trato intestinal (SCARCELLI; PIATTI, 2002). A contaminação da carne com conteúdo fecal durante o abate e processamento pode ser a justificativa para os resultados encontrados neste trabalho. Outros pesquisadores também confirmam a alta frequência de *E. coli* patogênica em produtos cárneos constituindo perigo real aos consumidores. Rhee et al. (2009) avaliaram a prevalência e classificação de *E. coli* patogênicas isoladas de

carnes e concluíram que 35,9% pertenciam ao grupo EHEC e 20,5% EPEC. De forma semelhante, Mohammed (2012), ao estudar sobre a caracterização molecular de *E. coli* patogênicas provenientes de produtos cárneos, verificou que 27,3% pertenciam ao grupo EHEC; 18,2% ao EPEC e 9,1% ao EIEC.

É válido ressaltar também a importância do achado, neste trabalho, de quatro estirpes de EHEC O157 e uma de EPEC O26, visto que podem ser classificadas como *E. coli* verotoxigênicas, sendo os principais sorotipos associados O45, O26, O91, O103, O111, O121, O145 e O157. Conforme Manning et al. (2007) e Prager et al. (2005) a infecção causada por tais sorotipos é uma das mais sérias formas de doença transmitida pelo alimento e pode causar complicações fatais.

As mesmas estirpes patogênicas isoladas, após identificação, foram submetidas ao teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos e o resultado é apresentado na Tabela 5.

**TABELA 5** - Comportamento das sete estirpes de *E. coli* patogênicas isoladas de “carpaços” frente aos antimicrobianos

Antimicrobianos	Comportamento		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Amicacina	0 (0%)	2 (28,6%)	5 (71,4%)
Ampicilina	1 (14,3%)	0 (0%)	6 (85,7%)
Cefalotina	0 (0%)	1 (14,3%)	6 (85,7%)
Cefotaxima	1 (14,3%)	0 (0%)	6 (85,7%)
Ceftadizima	1 (14,3%)	1 (14,3%)	5 (71,4%)
Sulfazotrin	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)
Aztreonam	1 (14,3%)	2 (28,6%)	4 (57,1%)
Cefoxitina	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)
Gentamicina	0 (0%)	2 (28,6%)	5 (71,4%)
Tetraciclina	1 (14,3%)	0 (0%)	6 (85,7%)
Cloranfenicol	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)
Ceftriaxona	0 (0%)	1 (14,3%)	6 (85,7%)

Neste estudo, 14,3% das estirpes isoladas foram resistentes a cinco antimicrobianos testados: ampicilina, cefotaxima, ceftadizima, aztreonam e tetraciclina. Apenas para cefoxitina e cloranfenicol o comportamento de 100% dos microrganismos foi sensível ao agente.

Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores, onde a resistência das estirpes de *E. coli* frente à tetraciclina é a mais frequentemente encontrada. Arslan e Eyi (2011), analisando carnes comercializadas no varejo, verificam que 55,6% das estirpes foram resistentes à tetraciclina e 50% à ampicilina. Koo e Woo (2012), estudando *E.coli* provenientes de produtos de origem animal, encontraram 74,7% de resistência à tetraciclina, seguido de 71% à estreptomicina e 51,2% à ampicilina. De forma semelhante, Zhao et al. (2012) compararam a resistência de *E.coli* isoladas de carnes no varejo entre os anos de 2002 e 2008 e verificaram também que a resistência a tetraciclina foi mais frequente (50,3%), seguida de estreptomicina (34,6%) e ampicilina (22,5%). Analisando estes achados, pesquisadores comprovaram, assim como observado no presente estudo, que as estirpes de *E.coli* isoladas de produtos cárneos carregam genes de resistência a antimicrobianos.

### 6.3 ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

Os resultados referentes às contagens de estafilococos coagulase positiva realizadas a partir de amostras de “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes estão inseridos na Tabela 6.

**TABELA 6** - Resultado das contagens de estafilococos coagulase positiva realizadas em “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes

Análise	Estabelecimentos	
	Bares	Restaurantes
Estafilococos coagulase positiva (log UFC/g)	4,00 ± 1,12 <sup>a</sup> (2,48 – 6,23) <sup>b</sup>	3,71 ± 1,18 (0,00 – 6,04)

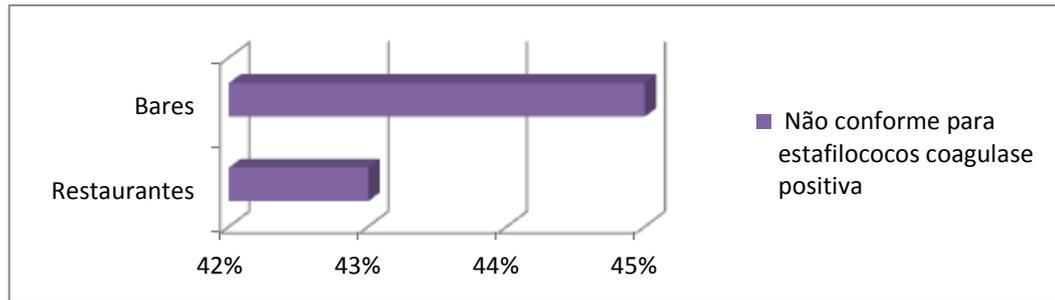
<sup>a</sup> Média ± desvio padrão

<sup>b</sup> Valor mínimo – máximo

A contagem de estafilococos coagulase positiva variou da ausência até o valor máximo encontrado de 6,23 log UFC/g. E conforme a análise estatística, onde  $p=0,353$ , verificou-se que não houve diferença significativa entre os resultados de bares e restaurantes. O risco do consumo do alimento nestas condições se resume a possibilidade da ingestão de toxinas formadas, quando ocorre a multiplicação dos microrganismos. Segundo Silva et al. (2010), a ingestão de uma dose menor que um micrograma pode provocar sintomas e essa quantidade pode ser atingida quando a população de estafilococos alcança valores acima de 7 log UFC/g. Porém neste estudo em nenhuma amostra foi encontrada contagem igual ou superior a 7 log UFC/g.

As altas contagens de estafilococos coagulase positiva observadas são preocupantes e podem ser explicadas pela manipulação inadequada, visto que os manipuladores são a fonte mais frequente de contaminação, já que funcionam como reservatórios destes microrganismos. Andrade, Silva e Brabes (2003) observaram que 71,9% dos manipuladores apresentaram até  $10^2$  UFC/mão. Vanzo e Azevedo (2003) e Evangelista-Barreto e Vieira (2003) obtiveram índices de 75% e 60%, respectivamente, confirmando a grande frequência deste microrganismo nos manipuladores de alimentos. Outra fonte comum de contaminação são os equipamentos e utensílios, principalmente em alimentos fatiados como o “carpaccio”, cujo fatiador pode representar importante veículo de microrganismos. Oliveira et al. (2008) observaram que a higienização falha dos equipamentos e mãos dos manipuladores foram determinantes para o aumento significativo nas contagens nas amostras de carne moída.

O padrão fixado em legislação permite contagens de valor máximo de  $5 \times 10^3$  UFC/g, ou 3,70 log UFC/g em pratos prontos para consumo a base de carne crua, como no caso do “carpaccio” (BRASIL, 2001). Desta forma, constatou-se que, neste estudo, em 45% dos bares e em 43% dos restaurantes os resultados foram insatisfatórios para estafilococos coagulase positiva, relacionando-os à deficiência na manipulação dos alimentos em grande parte dos estabelecimentos estudados (Figura 12) E, de acordo com o Fisher’s Exact test, onde  $p=0,254$ , não houve diferença estatística significativa quanto à proporção de amostras fora do padrão entre bares e restaurantes.



**Fig. 12** Frequência de estabelecimentos em não conformidade com padrões fixados para contagens de estafilococos coagulase positiva

As estirpes de estafilococos coagulase positiva isoladas das amostras de “carpaccio” foram submetidas ao teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos (Tabela 7). Porém, devido ao grande número de estirpes isoladas, foram analisadas apenas as quatro que apresentaram resultado 4+ na prova da coagulação (BRASIL, 2003), por serem relacionadas ao maior potencial patogênico.

**TABELA 7** - Comportamento das quatro estirpes de estafilococos coagulase positiva isoladas de “carpaccio” frente aos antimicrobianos

Antimicrobianos	Comportamento		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Clindamicina	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Eritromicina	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Oxaciclina	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Penicilina G	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Teicopamina	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Vancomicina	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Aztreonam	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Cefoxitina	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)
Gentamicina	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)
Tetraciclina	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)
Cloranfenicol	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)
Ceftriaxona	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)

Nesta avaliação, 100% das estirpes analisadas foram resistentes à clindamicina, eritromicina, oxaciclina, penicilina G, teicopamina, vancomicina e aztreonam e 50% à cefoxitina.

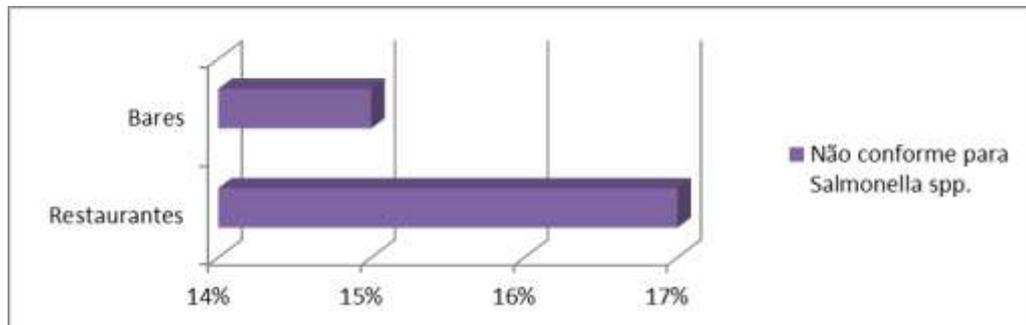
A elevada resistência dos isolados aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, e particularmente à penicilina, seria esperada devido ao seu uso generalizado no tratamento de infecções. A alta taxa de resistência às penicilinas limita o seu uso como alternativa na prevenção e tratamento de doenças estafilocócicas (ACCO et al. 2003). Além disso, segundo Rodrigues et al. (1997) a incidência de *S. aureus* oxacilina resistente aumentou, sendo este microrganismo considerado o principal agente clínico e epidemiológico em infecções hospitalares, ocorrendo também maior disseminação dessas estirpes em outros ambientes. Peresi et al. (2006) em estudo sobre a susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *S. aureus*, isoladas de alimentos envolvidos em surtos, encontraram uma estirpe oxacilina resistente. Considerando que, nos estudos de rastreamento epidemiológico da intoxicação estafilocócica, os manipuladores de alimentos são elementos incisivos no processo de disseminação do microrganismo, existe a possibilidade de que os isolados oxacilina resistente em alimentos sejam oriundos de pessoas infectadas. Tal fato confirma a disseminação desses patógenos em ambientes extra hospitalares e coloca os manipuladores de alimentos como possíveis disseminadores na comunidade, representando risco para a saúde pública.

A multirresistência dos estafilococos aos agentes antimicrobianos, quando o isolado é resistente a três ou mais antimicrobianos, é um assunto amplamente estudado e comprovado por inúmeros trabalhos científicos, tendo em vista sua grande importância em saúde coletiva. Neste estudo 100% das estirpes analisadas se apresentaram como multirresistentes. E da mesma forma, Pesavento et al. (2007) avaliaram a resistência de *S. aureus* isolados de carnes cruas e verificaram a grande quantidade de estirpes multirresistentes, embora não tenham encontrado nenhuma estirpe metilicina, teicopamina e vancomicina resistente.

#### 6.4 *Salmonella* spp.

Na legislação brasileira, o padrão fixado para análise de *Salmonella* spp. em “carpaccio” é ausência em 25g (BRASIL, 2001). Sendo assim, nota-se que 15% dos bares e 17% dos restaurantes analisados estavam em não conformidade, comercializando o alimento contaminado (Figura 13). E, de acordo com o Fisher's

Exact test ( $p=1,000$ ), não houve diferença estatística significativa quanto à proporção de amostras fora do padrão entre bares e restaurantes.



**Fig. 13** Frequência de estabelecimentos em não conformidade com padrões fixados para *Salmonella* spp.

Frequências semelhantes às obtidas no presente estudo foram encontradas em outros trabalhos com carne bovina em nível nacional e internacional. Panisello et al. (2000) relataram uma prevalência de 18,7% de espécies de *Salmonella* em carnes vermelhas, acarretada pela deficiência no controle de temperatura, manipulação imprópria das matérias-primas e condições ambientais inadequadas. Almeida, Gonçalves e Franco (2002) analisaram amostras de acém bovino inteiro e moído colhidos em estabelecimentos do Município do Rio de Janeiro e isolaram *Salmonella* de 25% das amostras do acém moído. Mrema, Mpuchane e Gashe (2006) em Botswana, encontram uma taxa de prevalência de 20%.

Com relação ao “carpaccio” de carne já foi descrito um importante surto alimentar causado por *Salmonella* spp. em um restaurante na Dinamarca devido a uma carne, que após a realização do rastreamento, era proveniente de outro país da União Europeia. Ethelberg et al. (2007) ressaltaram o alto risco do “carpaccio”, como prato a base de carne crua, na transmissão de agentes patogênicos e reforçaram a importância da rastreabilidade e vigilância internacional no controle de doenças alimentares.

A presença de *Salmonella* spp. em amostras de “carpaccio” e a frequência encontrada de cerca de 15 a 17% são fatos que merecem atenção devido ao alto risco de ocorrência de surtos alimentares e a necessidade de implantação de protocolos que visem reduzir a contaminação e/ou contaminação cruzada, especialmente em alimentos prontos para o consumo.

Analisando a metodologia de isolamento de *Salmonella* spp. e a eficiência dos caldos de enriquecimento seletivo e ágar de isolamento, verifica-se que das oito amostras positivas foram isoladas onze estirpes, e destas, 54,5% eram provenientes do enriquecimento em Caldo Selenito Cistina e seleção em Ágar *Salmonella* Diferencial, que é uma ligeira modificação da original formulação do Ágar Rambach. Estes meios se apresentaram como a melhor opção de isolamento no estudo, sendo que a passagem em caldo Rappaport Vassiliadis e Ágar *Salmonella* Diferencial também foi eficiente, com 45,5% da percentagem de isolamentos (Tabela 8). Estatisticamente, e de acordo com o McNemar Test, as duas combinações de meios não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p=1,000$ ), sendo ambas eficientes para isolamento de *Salmonella* spp.

**TABELA 8** - Resultado do isolamento de *Salmonella* spp. de acordo com os meios utilizados no estudo

Caldos de enriquecimento seletivo	Ágares de isolamento	Nº de isolamentos	Percentagem (%) de isolamentos
Rappaport Vassiliadis	<i>Salmonella</i> Diferencial	5	45,5%
	Verde Brilhante	0	0%
	Hektoen	0	0%
Selenito Cistina	<i>Salmonella</i> Diferencial	6	54,5%
	Verde Brilhante	0	0%
	Hektoen	0	0%
Total		11	100%

O enriquecimento seletivo é uma etapa crítica na detecção da contaminação de alimentos por salmonela, pois a seleção do meio adequado de enriquecimento permite obter alta especificidade e sensibilidade na detecção, enquanto o uso de meios inadequados pode levar à falha total no isolamento, representando risco ao consumidor. Em diversos estudos o caldo seletivo mais indicado é o Rappaport

Vassiliadis, visto sua capacidade de inibição de crescimento de microrganismos invasores (GELLI; RISTORI; BUZZO, 2003; SCHÖNENBRÜCHER; MALLINSON; BÜLTE, 2008).

Rall et al. (2005), em estudo com carne de frango, avaliaram a eficiência dos caldos de enriquecimento seletivo: Selenito Cistina (SC), Tetrationato (TT) e Rappaport Vassiliadis (RV) e os Ágares clássicos de isolamento: *Salmonella-Shigella*-Agar, Ágar Verde Brilhante, Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD) e dois ágares cromogênicos, o Rambach e CHROMagar *Salmonella*. Com os resultados descritos, o RV (69%) e TT (58.6%) foram mais eficientes que SC (24.1%). E com os meios cromogênicos obtiveram os melhores resultados, com menor frequência de colônias falsas positivas.

Posteriormente, as onze estirpes de *Salmonella* spp. isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos e os resultados constam na Tabela 9. O comportamento resistente foi mais frequente com a utilização dos antimicrobianos: ampicilina (81,8%), cefalotina (63,6%), cefoxitina (63,6%), ceftadizina (54,5%), aztreonam (54,5%), ceftriaxona (45,5%) e cefotaxima (45,45%). As estirpes foram 100% sensíveis a sulfazotrin, gentamicina e tetraciclina.

**TABELA 9** - Comportamento das onze estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de “carpaccio” frente aos antimicrobianos

Antimicrobianos	Comportamento		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Amicacina	0 (0%)	1 (9,1%)	10 (90,9%)
Ampicilina	9 (81,8%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)
Cefalotina	7 (63,6%)	1 (9,1%)	3 (27,3%)
Cefotaxima	5 (45,45%)	1 (9,1%)	5 (45,45%)
Ceftadizima	6 (54,5%)	1 (9,1%)	4 (36,4%)
Sulfazotrin	0 (0%)	0 (0%)	11 (100%)
Aztreonam	6 (54,5%)	0 (0%)	5 (45,5%)
Cefoxitina	7 (63,6%)	1 (9,1%)	3 (27,3%)
Gentamicina	0 (0%)	0 (0%)	11 (100%)
Tetraciclina	0 (0%)	0 (0%)	11 (100%)
Cloranfenicol	0 (0%)	1 (9,1%)	10 (90,9%)
Ceftriaxona	5 (45,5%)	3 (27,27%)	3 (27,27%)

Na literatura há diversos trabalhos que comprovam a resistência de *Salmonella* spp. frente aos agentes antimicrobianos. De forma semelhante aos resultados encontrados, Arslan e Eyi (2010) encontraram a maior frequência de resistência frente à ampicilina, com 64%. Thong e Modarressi (2011) descreveram também a resistência de estirpes isoladas de produtos cárneos com 17% para ampicilina, 8% para cefalotina e 2,2% para cefoxitina. Ethelberg et al. (2007) relataram um surto proveniente de um restaurante na Dinarmaca, atribuído a “carpaccio” contaminado com *Salmonella* Typhimurium resistente a seis classes de antimicrobianos diferentes. Com o resultado ressaltou-se a importância do sistema de vigilância internacional, assim como o controle sobre a segurança de alimentos.

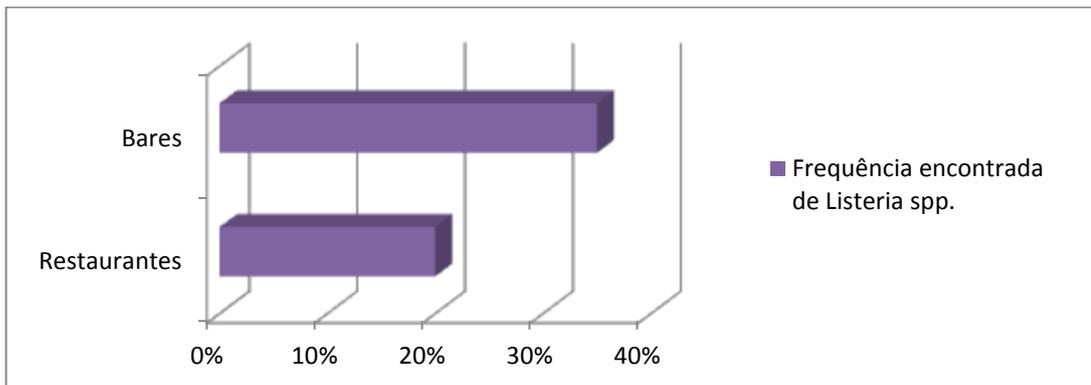
Diferentemente do presente estudo, Dallal et al. (2010) obtiveram 69% de resistência à tetraciclina, assim como, Thong e Modarressi (2011) que reportaram 73,8% à tetraciclina e 2,2% à gentamicina e Perez-Montano et al. (2012), que também encontraram estirpes resistentes à tetraciclina (46,2%) e gentamicina (19,2%).

Em alguns trabalhos também foram relatadas sensibilidades de sorotipos de *Salmonella* spp., isoladas de carne bovina. Mrema, Mpuchane e Gashe (2006) encontraram 100% de sensibilidade à gentamicina, cloranfenicol e ácido nalidíxico. Dias et al. (2008) obtiveram 100% de estirpes sensíveis a norfloxacino e ampicilina e 50% sensíveis à tetraciclina e cloranfenicol. Centikaya et al. (2012) encontraram 100% das estirpes isoladas de “cig kofte” sensíveis a todos os antimicrobianos testados, como ampicilina, amoxicilina com clavulanato, cloranfenicol, gentamicina, estreptomicina, tetraciclina, cefataxima e ceftazolina.

A multirresistência é outro fator que merece destaque. No presente estudo 81,8% das estirpes se apresentaram multirresistentes. Frequências menores, porém altas, foram descritas por Arslan e Eyi (2010) que observaram 62% das salmonelas multirresistentes, Dallal et al. (2010) 68,5% e Thong e Modarressi (2011) com 67% de multirresistência.

### 6.5 LISTERIA spp.

Conforme os resultados do presente estudo, 20% das amostras obtidas de restaurantes e 35% de bares estavam contaminadas com *Listeria* spp. (Figura 14). E, de acordo com o Fisher's Exact Test ( $p=1,000$ ), não houve diferença estatística significativa quanto à proporção de amostras contaminadas entre bares e restaurantes. Tendo em vista que, no Brasil, não há padrão estabelecido em legislação para *Listeria* spp. em produtos de origem animal, a simples presença do microrganismo no alimento pode ser considerado de alto risco aos consumidores.



**Fig. 14** Frequência encontrada de *Listeria* spp. em amostras de “carpaccio” comercializadas em bares e restaurantes.

Muitos autores comprovaram a presença frequente de *Listeria* spp. em produtos de origem animal. Soriano et al. (2001) avaliaram alimentos crus e prontos para consumo provenientes de restaurantes e verificaram a presença de *Listeria* spp. em 30% das amostras. Mantilla et al. (2007), analisando amostras de carne bovina moída resfriada comercializadas em estabelecimentos do município de Niterói, Rio de Janeiro, obtiveram uma frequência de 50% das amostras contaminadas com *Listeria* spp. De forma semelhante, Kovacevic, Mekac e Allen (2012) encontraram 20% das amostras de alimentos prontos para consumo contaminados com este microrganismo.

Com relação à ocorrência de espécies de *Listeria* neste estudo, a *L. welshimeri* foi isolada com maior frequência (81,82%), seguida da *L. grayi* (13,66%) e *L. monocytogenes* (4,55%). Não foram encontradas estirpes das espécies *L. ivanovii*, *L. innocua* e *L. seeligeri*.

Kovacevic, Mekac e Allen (2012), em estudo sobre alimentos prontos para o consumo, também verificaram que a *L. welshimeri* foi a mais comumente isolada, com 50% do total de listerias. Contudo, Sorano et al. (2001) encontraram apenas 1,9% de *L. welshimeri*, tendo como a mais frequente a *L. grayi*, com 13,6%.

Neste estudo, houve baixa ocorrência de *L. monocytogenes*, assim como em trabalhos similares. Yucel, Citak e Onder (2005) relataram uma frequência reduzida desta espécie em carnes bovinas, moídas e inteiras, e carne de frango, onde somente 6,16% das amostras estavam contaminadas. Samadpour et al. (2006) e Mantilla et al. (2007) também observaram um número pequeno de carnes moídas contaminadas com *L. monocytogenes*, 3,5% e 6,7%, respectivamente. Apesar das baixas ocorrências, com estes resultados verifica-se que estes alimentos ainda representam risco para saúde dos consumidores.

É necessário ressaltar que das 22 estirpes, 19 foram isoladas através da passagem no meio de plaqueamento Oxford, representando 86,4%, sendo o meio mais eficiente para isolamento de *Listeria* spp. em “carpaccio”. O ágar Mc Bride *Listeria* Agar (MMA) apresentou uma frequência de isolamento reduzida, de 13,6% e o ágar Triptose com ácido nalidíxico (ATN), apesar de ser o meio recomendado pelo método oficial para realização da análise de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos, não se mostrou eficiente neste trabalho (BRASIL, 2003) (Tabela 10). Estatisticamente, houve diferença significativa entre os isolamentos realizados com Oxford e com MMA ( $p=0,039$ ), sendo o Ágar Oxford considerado mais eficiente que o Ágar MMA.

**TABELA 10** - Frequência de isolamento de *Listeria* spp. em amostras de “carpaccio”, de acordo com o meio de plaqueamento utilizado

Ágares de isolamento	Nº de isolamentos	Porcentagem (%) de isolamentos
Oxford	19	86,4%
Mc Bride Listeria Agar	3	13,6%
Triptose com ácido nalidíxico	0	0%
Total	22	100%

Em estudo semelhante, porém com carne moída, Mantilla et al. (2008b) comparou três meios de plaqueamento para análise de listeria: o ágar “Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam” (LPM), o ágar MMA e o ágar Oxford. De acordo com os resultados apresentados, o ágar Oxford, assim como no presente trabalho, foi caracterizado como mais eficiente para o isolamento de *L. innocua* e *L. monocytogenes*, sendo que no ágar LPM não ocorreu o isolamento de nenhuma estirpe de *L. innocua* e no ágar MMA nenhuma de *L. monocytogenes*.

As estirpes isoladas e identificadas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, cujo resultado consta a seguir (Tabela 11).

**TABELA 11** - Comportamento das espécies de *Listeria* isoladas de “carpaccio”, frente aos agentes antimicrobianos

Antimicrobianos	Comportamento		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Clindamicina	5 (22,7%)	10 (45,5%)	7 (31,8%)
Eritromicina	4 (18,2%)	2 (9,1%)	16 (72,7%)
Oxaciclina	4 (18,2%)	1 (4,5%)	17 (77,3%)
Penicilina G	4 (18,2%)	0 (0%)	18 (81,8%)
Teicopamina	2 (9,1%)	0 (0%)	20 (90,9%)
Vancomicina	2 (9,1%)	0 (0%)	20 (90,9%)
Aztreonam	14 (63,6%)	3 (13,6%)	5 (22,7%)
Cefoxitina	2 (9,1%)	1 (4,5%)	19 (86,4%)
Gentamicina	1 (4,5%)	0 (0%)	21 (95,5%)
Tetraciclina	0 (0%)	1 (4,5%)	21 (95,5%)
Cloranfenicol	3 (13,6%)	0 (0%)	19 (86,4%)
Ceftriaxona	12 (54,5%)	2 (9,1%)	8 (36,4%)

Neste estudo, as estirpes de *Listeria* spp. foram resistentes, com variações de percentuais, a todos os agentes antimicrobianos testados, exceto à tetraciclina, onde o comportamento de 95,5% foi sensível e de 4,5% das estirpes foi intermediário. Nota-se que a maior resistência ocorreu frente aos antimicrobianos aztreonam e Ceftriaxona, e 68,75% das estirpes apresentaram comportamento multirresistente.

Em trabalhos similares, Yucel, Citaka e Onder (2005) isolaram espécies de *Listeria*, oriundas de carne bovina e produtos cárneos, onde 100% foram resistentes a cefalotina e evidenciaram a multirresistência a mais de um agente antimicrobiano, principalmente frente à ampicilina, cefalotina e ácido nalidíxico. Mantilla et al. (2008a) estudaram a resistência de *Listeria* spp. isoladas de carne moída e verificaram que todas as estirpes de *L. monocytogenes* apresentaram resistência aos antimicrobianos: clindamicina, oxaciclina, gentamicina, sulfazotrim, cefoxitina e ampicilina. Também foram encontradas estirpes desta mesma espécie resistentes a outros antimicrobianos indicados no tratamento da listeriose humana, como por exemplo, tetraciclina e eritromicina. Todos os 100% dos isolados testados foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos. De forma semelhante, Ruiz-Bolivar et al. (2011) analisando alimentos provenientes de diferentes cidades da Colômbia, verificaram alta resistência das estirpes de *Listeria* frente à clindamicina, rifampicina,

ciprofloxacino e a antimicrobianos de primeira escolha contra listeriose, caracterizando um sério problema para a saúde coletiva, principalmente para os indivíduos que fazem parte do grupo de risco da listeriose, que incluem os idosos, crianças, mulheres grávidas e imunodeprimidos.

Os resultados aqui apresentados são importantes e contribuem como dados sobre a exposição e a incidência de *Listeria* spp. em “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes. Tendo em vista as avaliações de riscos recentes de *L. monocytogenes* em alimentos, pode-se inferir que há um risco considerável para os consumidores deste prato em adquirir listeriose. A predileção do consumo de “carpaccios”, que não são submetidos a tratamento térmico antes do consumo, como entrada para uma refeição, pode representar um risco particular se não forem manipulados corretamente e armazenados adequadamente sobre refrigeração, muito embora os animais de açougue possam ser portadores assintomáticos do patógeno, que pode se manter viável na matriz alimentícia mesmo em baixas temperaturas.

## 6.6 TEMPERATURA E pH

Os resultados das medições de temperatura e pH das amostras de “carpaccio” estão descritas a seguir (Tabela 12).

**TABELA 12** - Valores de temperatura e pH das amostras de “carpaccio” provenientes de bares e restaurantes

Análise	Estabelecimentos	
	Bares	Restaurantes
Temperatura (°C)	6,8 ± 0,47 <sup>a</sup> (-4,0 – +26,5) <sup>b</sup>	4,9 ± 0,46 (-2,3 - +26,8)
pH	5,92 ± 0,32 (5,60 – 6,80)	5,74 ± 0,27 (5,30 – 6,40)

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão

<sup>b</sup> Valor mínimo – máximo

A temperatura das amostras foi medida no momento da aquisição do produto e foi um item muito variável, tendo estabelecimentos que forneceram “carpaccios” ainda congelados, com temperaturas negativas e outros onde o produto estava bem acima da temperatura ideal de armazenamento, chegando ao valor máximo de 26,8°C. Com relação à comparação entre resultados de bares e restaurantes, e de acordo com o Mann Whitney Test, onde  $p=1,000$ , foi observado que não houve diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Tendo por base a temperatura de 4,0°C como valor máximo para conservação de carnes frescas, verificou-se que 30% dos bares e 30% dos restaurantes estavam em não conformidade, apresentaram o “carpaccio” em temperatura acima do ideal.

Os resultados encontrados referentes às temperaturas das amostras de “carpaccio” são similares aos do estudo de Góes et al. (2004), que avaliaram a adequação da temperatura de conservação de alimentos refrigerados quanto às recomendações do fabricante de carnes e derivados e diagnosticou que 30% das amostras avaliadas estavam fora dos padrões estabelecidos. Em outro trabalho semelhante, Conceição e Gonçalves (2009) verificaram que 60% das amostras de carne bovina moída e outros produtos de origem animal, comercializados nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói, estavam sendo armazenadas a temperaturas inadequadas, oferecendo riscos à qualidade higiênico sanitária do produto e, conseqüentemente, à saúde do consumidor.

Com relação aos valores de pH, observa-se na Tabela 12 que as médias variaram entre 5,74 e 5,92, tendo como valor máximo encontrado 6,80. E, conforme a comparação entre resultados de bares e restaurantes, onde  $p=0,155$ , foi observado que não houve diferença estatística ao nível de 5% de significância. E, tomando como base o valor de 6,4 como máximo para carnes frescas próprias para consumo verificou-se que 4%, ou seja, apenas duas amostras, de todas as amostras analisadas possuíam valores acima do máximo permitido e estavam impróprias para consumo. É necessário ressaltar que as duas foram provenientes de bares.

Utilizando a análise de correlação linear de Pearson, verificou-se que não houve correlação positiva ( $r \geq 0,600$ ) entre o pH, temperatura e os resultados das análises quantitativas realizadas no estudo.

## 7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Baseando-se nos objetivos iniciais e nos resultados obtidos e discutidos neste estudo, pode-se concluir que:

- A grande variação na temperatura das amostras de “carpaccio” adquiridas de bares e restaurante serve como indício de falhas no armazenamento do produto, por estar exposto a temperaturas inadequadas, oferecendo condições favoráveis à multiplicação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, colocando em risco a qualidade higiênica e sanitária do produto e, conseqüentemente, à saúde do consumidor.

- A grande maioria das amostras apresentaram o pH dentro do padrão estabelecido, porém duas amostras provenientes de bares possuíram valores acima do máximo permitido, sendo consideradas impróprias para consumo.

- Apesar de não haver padrão fixado em legislação brasileira, através das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, contagens de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas e contagens de coliformes totais e termotolerantes foram reveladas altas frequências, sendo indicativa de baixa qualidade do produto podendo estar relacionada com grau de deterioração, deficiência na sanitização, falha do controle do processo ou de matérias primas.

- A quantidade expressiva de *E. coli* nas amostras de “carpaccio” é um indicativo de contaminação fecal, sendo as estirpes do grupo EHEC as mais frequentemente encontradas, particularmente o sorogrupo EHEC O157, responsável pelas formas mais graves da doença de origem alimentar, agravando o risco no consumo deste alimento.

- As estirpes de *E. coli* isoladas e sorotipadas como patogênicas apresentaram resistência aos antimicrobianos testados e usados rotineiramente, com susceptibilidade equivalente à ampicilina, cefotaxima, ceftadizima, aztreonam e tetraciclina.

- O microrganismo de maior ocorrência nas amostras de “carpaccio” foi estafilococos coagulase positiva, apresentando 44% das amostras com contagens acima do padrão estabelecido pela legislação vigente, sendo indicativo de falhas no processo de higiene e deficiências na manipulação.

- As estirpes de estafilococos coagulase positiva analisadas foram 100% resistentes à clindamicina, eritromicina, oxaciclina, penicilina G, teicopamina, vancomicina e aztreonam. Com a elevada ocorrência de multirresistência foi demonstrado o risco potencial para a saúde pública, dificultando o tratamento de doenças e agravando quadros clínicos potencialmente curáveis.

- Com fato de cerca de 15 a 17% das amostras de “carpaccios” estarem contaminadas com *Salmonella* spp. enfatiza-se a necessidade de implantação de protocolos que visem reduzir a contaminação e/ou contaminação cruzada, também em bares e restaurantes, especialmente na produção de alimentos consumidos crus devido ao risco potencial de ocorrência de surtos alimentares.

- O enriquecimento em Caldo Selenito Cistina e seleção em Ágar *Salmonella* Diferencial se apresentaram como a melhor opção de isolamento no estudo, sendo que a passagem em Caldo Rappaport Vassiliadis e Ágar *Salmonella* Diferencial também foi eficiente. Estatisticamente, as duas combinações de meios não apresentaram diferenças significativas entre si.

- O comportamento resistente das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas foi mais frequente com a utilização dos antimicrobianos: ampicilina, cefalotina, ceftaxima, ceftadizina, aztreonam, ceftriaxona e cefotaxima, respectivamente.

- Apesar de não haver padrão estabelecido na legislação brasileira, uma frequência expressiva de *Listeria* spp. foi encontrada nas amostras, sendo maior que a prevalência encontrada de *Salmonella* spp. A espécie isolada com maior frequência foi *L. welshimeri*, seguida da *L. grayi* e *L. monocytogenes*.

- O meio de plaqueamento Oxford foi o mais eficiente para isolamento de *Listeria* spp. em “carpaccio”. No ágar Mc Bride *Listeria* Agar (MMA) foi encontrada uma frequência de isolamento reduzida e o ágar Triptose com ácido nalidíxico (ATN), apesar de ser o meio recomendado pelo método oficial para realização da análise de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos, não foi eficiente neste trabalho. Pelo exposto, sugere-se a inclusão do Ágar Oxford como meio indicado para o isolamento de *Listeria* spp. em produtos cárneos, como “carpaccio”.

- A confirmação de estirpes resistentes aos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de listeriose e a alta taxa de multirresistência constituem um grave problema de saúde coletiva, especialmente para indivíduos que fazem parte do grupo de risco.

- Embora o “carpaccio” seja um prato pronto para consumo à base de carne crua, a elevada contaminação das amostras, acima dos padrões estabelecidos em legislação, leva à interpretação de que é necessária uma maior preocupação dos consumidores, dos manipuladores de alimentos e dos órgãos fiscalizadores com fatores relacionados à qualidade higiênica sanitária da matéria prima, às condições de preparo e higiene dos estabelecimentos.

- Ao comparar os resultados das análises quantitativas realizadas no estudo, verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre bares e restaurantes. Da mesma forma, não houve diferença estatística significativa quanto à proporção de amostras fora do padrão, quando comparadas entre bares e restaurantes.

- Quanto à associação entre temperatura, pH e microbiota encontrada nas amostras, não foi verificado estatisticamente correlação positiva ( $r \geq 0,600$ ), sendo que a associação entre as contagens de BHAM e BHAP, apesar da correlação negativa, a proximidade dos valores de  $r$  dá indícios de correlação, sendo necessário número superior de amostras para avaliação correta da relação.

- Houve correlação positiva entre as contagens de coliformes totais com BHAM e com BHAP, o que pode ser explicado pela grande variedade de espécies mesófilas e psicrótróficas que pertencem ao grupo dos coliformes capazes de colonizar plantas de processamento de alimentos.

Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo, verifica-se a baixa qualidade de grande parte dos “carpaccios” comercializados em bares e restaurantes. E para melhorar a qualidade higiênica e sanitária dessas matrizes alimentícias são necessárias práticas eficazes que incluem: educação sanitária com treinamentos periódicos para manipuladores de alimentos; práticas de higiene pessoal e do ambiente; aplicação de protocolos como as boas práticas de manipulação e a análise de perigos e pontos críticos de controle; garantia de qualidade desde a matéria prima até o produto final e o monitoramento de indicadores microbiológicos, sendo essenciais os dados quantitativos, a fim de minimizar os riscos de aquisição de bactérias patogênicas, na ingestão deste alimento. Igualmente, é essencial um controle eficiente por parte da vigilância sanitária através de fiscalizações periódicas e correções enérgicas quanto à ocorrência de infrações, visando à melhoria da qualidade dos alimentos ofertados aos consumidores.

Além disso, a possibilidade do aparecimento de bactérias com potencial patogênico, selecionadas quanto ao caráter de resistência aos antimicrobianos, reforça a importância das pesquisas envolvendo microrganismos emergentes associados a perfis de resistência.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCO, M.; FERREIRA, F.S.; HENRIQUES, J.A.P.; TONDO, E.C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiology*, v.20, n.5, p.489–493, 2003.
- ALMEIDA, A.S. de; GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M. *Salmonella* em corte de carne bovina inteiro e moído. *Higiene Alimentar*, v.16, n.96, p.77-81, 2002.
- ANDRADE, N.J. de; SILVA, R.M.M. da; BRABES, K.C.S. Avaliação das condições microbiológicas em Unidades de alimentação e nutrição. *Ciência e Agrotecnologia*, v.27, n.3, p.590-596, mai./jun., 2003.
- ARSLAN, S.; EYI, A. Occurrence and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* Species in Retail Meat Products. *Journal of Food Protection*, v.73, n. 9, p.1613-1617, 2010.
- ARSLAN, S.; EYI, A. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Escherichia coli* from retail meats. *Journal of Food Safety*, v.31, n.2, p. 262-267, 2011.
- BARROS, M.A.F.; BELOTI, V.; HAGA, M.M.; CAVALETTI, L.; D'OVÍDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; NERO, L.A. *Listeria* spp. ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, n. 4, p. 341-348, out./dez. 2004.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, p.493-496, 1966.

BORELLI, B.M.; FERREIRA, E.G.; LACERDA, I.C.A.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; SILVA, M.C.C.; ROSA, C.A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of canastra cheese, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.545-550, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº1 de 7 de outubro de 1981. Aprova os Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, constituindo-se em Métodos Microbiológicos e Métodos Físicos e Químicos. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, D.F., p. 19381, 13 out. 1981. Seção 1.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes* – LANARA. Brasília, 1989.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, D.F., p.45-53, 10 jan. 2001. Seção 1.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 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. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, D.F., p. 14, 18 set. 2003. Seção 1.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J. de; SANTOS, D.A.dos; FARIA, M.E. de; PENA, E.C.; JETT, M; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*. v.19, n.1, p.9-14, 2002.

CETINKAYA, F.; MUS, T.E.; CIBIK, R.; LEVENT, B.; GULESEN, B. Assessment of microbiological quality of cig kofte (raw consumed spiced meatball): Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella*. *Food Control*, v.26, n.1, p. 15-18, 2012.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.2, n.1, p. 22-32, 2003.

CONCEIÇÃO, F.V.E. da; GONÇALVES, E.C.B.A. Qualidade físico-química de mortadelas e carnes moídas e conhecimento dos consumidores na conservação destes produtos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.2, p.283-290, abr./jun. 2009.

COUSIN, M.A.; JAY, J.M.; VASAVADA, P.C. Psychrotrophic microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ed. American Public Health Association, Washington: D.C., 2001. cap. 13, p.159-166.

CUNHA, M.L.R.S. *Staphylococcus aureus*: toxinas e saúde pública. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4., 2007. *Anais...* Botucatu: FMVZ – UNESP, 2007. p. 56-63.

DALLAL, M.M.S.; DOYLE, M.P.; REZADEHBASHI, M.; DABIRI, H.; SANAEI, M.; MODARRESI, S.; BAKHTIARI, R.; SHARIFIY, K.; TAREMI, M.; ZALI, M.R.; SHARIFI-YAZDI, M.K. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food Control*, v.21, n.4, p.388-392, 2010.

DEN AANTREKKER, E.D.; BOOM, R.M.; ZWIETERING, M.H.; SCHOTHORST, M.V. Quantifying recontamination through factory environments—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 80, n. 2, p. 117-130, jan., 2003.

DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH (DSMZ). *Bacterial nomenclature up-to-date, 2011*. Disponível em: [http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial\\_nomenclature\\_info.php?genus=Listeria](http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Listeria) Acesso em: 10 ago. 2012.

DIAS, P.A.; CONCEIÇÃO, R.C.S. da; COELHO, F.J.O.; TEJADA, T.S.; SEGATTO, M.; TIMM, C.D. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, n.3, p.359-363, jul./set., 2008.

DI GIACOMO, R.F.; KOEPEL, T.D. Sampling for Detection of Infection or Disease in Populations. *Journal American of Veterinary Research*, v. 20, p. 176-179, 1986.

EBONE, M.V.; CAVALLI, S.V.; LOPES, S.J. Segurança e qualidade higiênico-sanitária em unidades produtoras de refeições comerciais. *Revista de Nutrição*, v.24, n.5, set./out., 2011.

ETHELBERG, S.; SORENSEN, G.; KRISTENSEN, B.; CHRISTENSEN, K.; KRUSELL, L.; HEMPEL-JORGENSEN, A; PERGE, A.; NIELSEN, E.M. Outbreak with multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 linked to carpaccio, Denmark, 2005. *Epidemiology and Infection*, v.135, p.900–907, 2007.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; VIEIRA, R.H.S.FE. Investigação sobre possíveis portadores de *Staphylococcus aureus* em duas indústrias de pesca. *Higiene Alimentar*, v.7, n.104/105, p.49-57, jan./fev. 2003.

FARIAS, W.V.L.; SADER, H.S.; LEME, I.L.; PIGNATARI, A.C. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas em 12 hospitais. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n.3, p. 199-204. 1997.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm>> Acesso em: 11 jul. 2012.

FERNANDEZ, A.T.; FORTES, M.L.M; ALEXANDRE, M.H.S.; BASTOS, C.S.P.; VIANA, E.P.L. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade do Rio de Janeiro. *Higiene Alimentar*. v.17, n.111, p.58-63, 2003.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. 182p.

FREON, J. D.; REOLON, J. I. Qualidade dos produtos derivados de carne e leite, industrializados pelas agroindústrias de Frederico Westphalen, RS. *Higiene Alimentar*, v.21, n.140, p. 53-59, 2006.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer-Verlag, 2001, v.1, p. 119-166.

GELLI, D.S.; RISTORI, C.A.; BUZZO, A.A. Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella* ssp. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.62, n.3, p.159-164, 2003.

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

GÓES, J. A.W.; SILVA, A.V. da; FRACALOSSO, L.M.; KUWANO, E.A. Condições de conservação de alimentos armazenados por refrigeração na cidade de Salvador, Bahia. *Higiene Alimentar*, v. 18, n.125, p.41-43, out., 2004.

HOFFMANN, F.L. Fatores limitantes à proliferação de microrganismos em alimentos. *Brasil Alimentos*, n.9, jul./ago., 2001.

HOLT, J.P.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S,T. Facultatively anaerobic Gram negative rods. In:\_\_\_\_\_. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup>ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994a. 787p. group 5, p.175-289.

HOLT, J.P.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S,T. Gram positive cocci. In:\_\_\_\_\_. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup>ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994b. 787p. group 7, p. 532.

HOLT, J.P.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic Gram negative rods. In:\_\_\_\_\_. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994c. 787p. group 5, p.186-187.

HOLT, J.P.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Regular, nonsporing Gram positive rods. In:\_\_\_\_\_. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994d. 787p. group 19, p.566-567.

INGHAM, S. C.; BEUGE, D. R.; DROPP, B. K.; LOSINSKI, J. A. Survival of *Listeria monocytogenes* during storage of ready-to-eat meat products processed by drying, fermentation, and/or smoking. *Journal of Food Protection*, v.67, p. 2698-2702, 2004.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microorganisms in Food. 2- Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. 2 ed. Toronto: University of Toronto Press, 1986.

\_\_\_\_\_. *Microorganisms in Foods 5 - Microbiological Specifications of Food Pathogens*. London: Blackie Academic & Professional, 1996.

JAY, J.M. *Microbiologia dos alimentos*. Editora Guanabara Koogan, 2005. 711p.

JULIÃO, A. M.; COSTA, P. S. Avaliação microbiológica e controle da produção de carne resfriada homogeneizada de bovino, preparada em nível varejista no Estado do Rio de Janeiro. *Higiene Alimentar*, v.16, n.96, p.94-99, 2002.

KESKINEM, L.A.; TODD, E.C.D.; RYSER, E.T. Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* during slicing of delicatessen meats. *International Journal of Food Microbiology*, v.127, n.3, p.298-304, 2008.

KOO, J.H.; WOO, G.J. Characterization of Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Recovered from Foods of Animal and Fish Origin in Korea. *Journal of Food Protection*, v.75, n. 5, p.966-972, 2012.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 4.ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676p. cap.8, p.69-82.

KOVACEVIC, J.; MESAK, L.R.; ALLEN, K.J. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. *Food Microbiology*, v.30, p.372-378, 2012.

KOUTSOUMANIS, K.; STAMATIOU, A.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G.J.E. Development of a Microbial Model for the Combined Effect of Temperature and pH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model under Dynamic Temperature Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.1, p.124-134, jan., 2006.

LUCHESE, R.H.; BORGES, J.T.S; MAIA, L.H; FREITAS, A.S. Identificação dos pontos críticos de controle na preparação de carne bovina assada, em Unidades de Alimentação e Nutrição. *Higiene Alimentar*, v.17, n.198, p. 36-41, 2003.

LUCQUIN, I.; ZAGOREC, M.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M.; CHAILLOU, S. Fingerprint of lactic acid bacteria population in beef carpaccio is influenced by storage process and seasonal changes. *Food Microbiology*, v.29, p.187-196, 2012.

LUNDGREN, P.U.; SILVA, J.A. da; MACIEL, J.F.; FERNADES, T.M. Perfil da qualidade higiênico-sanitária da carne bovina comercializada em feiras livres mercados públicos de João Pessoa/PB-Brasil. *Alimentos e Nutrição*, v.20, p.113-119, jan./mar., 2009.

MANNING, S.D., MADERA, R.T., SCHNEIDER, W., DIETRICH, S.E., KHALIFE, W., BROWN, W., WHITTAM, T.S., SOMSEL, P., RUDRICK, J.T. Surveillance for Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*, Michigan, 2001–2005. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, n. 2, p.318–321, 2007.

MANTILLA, S.P.S; FRANCO,R.M; OLIVEIRA, L.A.T; SANTOS, E.B.S.; GOUVÊA, R. Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina moída comercializadas no município de Niterói, RJ, Brasil. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 4, p. 1225-1230, jul./ago., 2007.

MANTILLA, S.P.S; FRANCO,R.M; OLIVEIRA, L.A.T; SANTOS, E.B.S.; GOUVÊA, R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45, n.2, p. 116-121, 2008a.

MANTILLA, S.P.S; FRANCO,R.M; OLIVEIRA, L.A.T; SANTOS, E.B.S.; GOUVÊA, R. Comparação entre a eficiência de três meios de plaqueamento no isolamento de *Listeria* spp. a partir de carne moída. *Higiene Alimentar*, v.22, n.166/167, p.166-171, nov./dez. 2008b.

MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. *Veterinary Epidemiology – Principles and Methods*. Iowa State University Press: Anes, Iowa, 1987. 343p.

MIDURA, T.F.; BRYANT, R.G. Sampling Plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. In: DOWNES, F.P; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*.4.ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. cap. 2, p. 13-23.

MOHAMMED, M.A.M. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from meat products sold at Mansoura city, Egypt. *Food Control*, v.25, p.159-164, 2012.

MOTTA, M. R. A.; BELMONTE, M. A. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. *Higiene Alimentar*, v.14, n.78-79, p.59-62, 2000.

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

NAWAZ, M.S.; ERICKSON, B.D.; KHAN, A.A.; KHAN.S.A.; POTHULURI, J.V.; RAFIL, F.; SUTHERLAND, J.B.; WAGNER, R.D.; CERNIGLIA, C.E. Human Health Impact and Regulatory Issues Involving Antimicrobial Resistance in the Food Animal Production Environment. *Food and Drug Administration: Regulatory Research Perspectives*, v.1, n.1, jul., 2001.

OLIVEIRA, S. P. de; FREITAS, F.V.; MUNIZ, L.B.; PRAZERES, R. Condições higiênico-sanitárias do comércio de alimentos do município de Ouro Preto, MG. *Higiene Alimentar*, v. 19, n. 136, p. 26-31, 2005.

OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P.; ALMEIDA FILHO, E.S. de; GONÇALVES, P.M.R. Biofilme na indústria de alimentos: revisão. *Higiene Alimentar*, v. 20, n.141, p. 33-35, 2006.

OLIVEIRA, M.M.M. de; BRUGNERA, D.F.; MENDONÇA, A.T.; PICCOLI, R.H. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. *Higiene Alimentar*, v.32, n. 6, p.1893-1898, nov./dez. 2008.

OLIVEIRA, A.M.; MIYA, N.T.N.; SANT'ANA, A.S.; PEREIRA, J.L. Behavior and Enterotoxin Production by Coagulase Negative *Staphylococcus* in Cooked Ham, Reconstituted Skimmed Milk, and Confectionery Cream. *Journal of Food Science*, v.75, n.7, p. M475-M481, 2010.

ORDÓÑEZ, J.A. *Tecnología de alimentos – volume II: alimentos de origem animal*. Trad. Fátima Murad. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279p. Tradução de: *Tecnología de los alimentos – volumen II: alimentos de origen animal*.

PANISELLO, P. J.; ROISON, R.; QUANTICK, P. C.; ROSALIND, S. Application of foodborne diseases outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *International Journal of Food Microbiology*, v.59, p.221–234, 2000.

PAPADOPOULOU, O.S.; CHORIANOPOULOS, N.G.; GKANA, E.N.; GROUNTA, A.V.; KOUTSOUMANIS, K.P.; NYCHAS, G.-J.E. Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. *Meat Science*, v.90, p. 865-869, 2012.

PARDI, M.C; SANTOS, I.F. dos; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*. 2. Ed. Goiânia: Editora da UFG, 2001. 623p.

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; CARDIGA, E.A.; MARQUES, D.F.; CARNICEL, F.A.; HOFMANN, F.L. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 65, n. 2, p. 112-117, 2006.

PEREZ-MONTANO, J.A.; GONZALEZ-AGUILAR, D.; BARBA, J.; PACHECO-GALLARDO, C.; CAMPOS-BRAVO, C.A.; GARCIA, S.; HEREDIA, N.L.; CABRERA-DIAZ, E. Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. *Journal of Food Protection*, v.75, n. 5, p.867-873, 2012.

PEREZ-RODRIGUEZ, F.; CASTRO, R.; POSADA-IZQUIERDO, G. D.; VALERO, A.; CARRASCO, E.; GARCIA- GIMENO, R. M; ZUREDA, G. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. *Meat Science*, v. 86, p.479–485, 2010.

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control*, v.18, n.3, p.196–200, 2007.

PRAGER, R., ANNEMULLER, S., TSCHAPE, H. Diversity of virulence patterns among shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases – need for more detailed diagnostics. *International Journal of Medical Microbiology*, v.295, p. 29–38, 2005.

RALL, V.L.M.; RALL, R.; ARAGON, L.C.; SILVA, M.G. da. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, n.2, p.147-150, 2005.

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

RODRIGUES, E.A.C.; MENDONÇA, J.S.; AMARANTE, J.M.B.; ALVES FILHO, M.B.; GRINBAUN, R.S.; NRICTMANN R. *Infecções hospitalares: prevenção e controle*. São Paulo: Ed. Sarvier, 1997. 669 p.

RODRIGUEZ, M.; NUNEZ, F.; CORDOBA, J.J.; BERMUDEZ, E.; ASENSIO, M.A. Gram-positive, catalase cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.6, p.1897-1902, 1996.

RODRIGUEZ, C.A.; VESGA, O. Staphylococcus aureus resistente a vancomicina. *Biomédica*, v. 25, p. 575-587, 2005.

RUIZ-BOLIVAR, Z.; NEUQUE-RICO, M.C.; POUTOU-PINALES, R.A.; CARRASCAL-CAMACHO, A.K.; MATTAR, S. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* food isolates from different cities in Colombia. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.8, n.8, p. 913-919, 2011.

SAMADPOUR, M.; BARBOUR, M.W.; NGUYEN, T.; CAO, T.M.; BUCK, F.; DEPAVIA, G.A.; MAZENGA, E.; YANG, P.; ALFI, D.; LOPES, M.; STOPFORTH, J.D. Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts, and mushrooms. *Journal of Food Protection*, v.69, n.2, p.441-443, 2006.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M. Patógenos Emergentes Relacionados a contaminação de Alimentos de Origem Animal. *Biológico*, v.64, n.2, p.123-127, jul./dez., 2002.

SCHÖNENBRÜCHER, V.; MALLINSON, E.T.; BÜLTE, M. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media. *International Journal of Food Microbiology*, v.123, n. 1–2, p.61–66, 2008.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011\*, 2011. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos\\_dta\\_15911.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf) Acesso em: 1 ago. 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S. dos; GOMES, R.A.R. *Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água*. 4.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 632p.

SORIANO, J.M.; RICO, H.; MOLTO, J.C.; MANES, J. *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants. *Journal of Food Protection*, v.64, n.4, p.551-553, 2001.

SORUM, H.; L'ABEE-LUND, T.M. Antibiotic resistance in food-related bacteria - a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*, v.78, p. 43–56, 2002.

TASKILA, S.; TUOMOLA, M.; OJANO, H. Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*. *Food Control*, v. 26, n.2, p.369–377, 2012.

TAVARES, V. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33, n.3, mai./jun. 2000.

THONG, K.L.; MODARRESSI, S. Antimicrobial resistant genes associated with *Salmonella* from retail meats and street foods. *Food Research International*, v.44, n. 9, p.2641-2646, 2011.

VANZO, S.P.; AZEVEDO, R.V.P. Detecção de *S. aureus* em manipuladores de alimentos: perfil de resistência a antibióticos e quimioterápicos. *Higiene Alimentar*, v.17, n.104/105, p.114-123, jan./fev. 2003.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococcal isolated from goats and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v.30, n.3, p.271-280, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005. Drug-resistance Salmonella. *Fact Sheet Nº 139*. Revised April 2005. Disponível em:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> Acesso em: 5 jun. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety and foodborne illness, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html>>. Acesso em: 18 jul. 2012.

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

ZHAO, S. BLICKENSTAFF, K.; BODEIS-JONES, S.; GAINES, S.A.; TONG, E.; MCDERMOTT, P.F. Comparison of the Prevalences and Antimicrobial Resistances of *Escherichia coli* Isolates from Different Retail Meats in the United States, 2002 to 2008. *Applied and Environmental Microbiology*, v.78, n.6, p.1701-1707, 2012.

## 9 APÊNDICES

### 9.1 ARTIGOS SUBMETIDOS A PERÍODICOS CIENTÍFICOS

9.1.1 **Contaminação bacteriana de carpaccios de carne bovina comercializados em bares e restaurantes.** Submetido à Revista Brasileira de Ciência Veterinária (em avaliação).

9.1.2 **Ocorrência e susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* patogênica isoladas de carpaccio de carne bovina.** Submetido ao “Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science” (em avaliação).

9.1.3 ***Listeria* spp. em carpaccio de carne bovina e perfil de resistência aos agentes antimicrobianos.** Submetido aos Arquivos do Instituto Biológico (em avaliação).

### 9.2 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

9.2.1 **Qualidade de carpaccios de carne provenientes de bares e restaurantes.** Aceito para apresentação no VI Congresso Latino Americano e XII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos.

9.2.2 **Estafilococos coagulase positivo em carpaccio de carne bovina.** Aceito para apresentação no VI Congresso Latino Americano e XII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos.