

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATO DE OLIVEIRA PEREIRA

PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM LINGUIÇAS ARTESANAIS TIPO MISTAS,
PRODUZIDAS EM MERCADOS E AÇOUQUES NO MUNICÍPIO DE TERRA
ROXA (PARANÁ)

PALOTINA

2019

RENATO DE OLIVEIRA PEREIRA

PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM LINGUIÇAS ARTESANAIS TIPO MISTAS,
PRODUZIDAS EM MERCADOS E AÇOUQUES NO MUNICÍPIO DE TERRA ROXA
(PARANÁ)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia aplicada a saúde animal, Setor Palotina, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dra. Edna Tereza de Lima

PALOTINA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P436 Pereira, Renato de Oliveira
Pesquisa de *Salmonella spp.* em linguiças artesanais tipo mistas, produzidas em mercados e açougues no município de Terra Roxa (Paraná) / Renato de Oliveira Pereira – Palotina, 2019.
35f.

Orientador: Edna Tereza de Lima
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Alimento 3. Embutidos.
4. PCR. I. Lima, Edna Tereza. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **RENATO DE OLIVEIRA PEREIRA** intitulada: **PESQUISA DE SALMONELLA SPP. EM LINGUIÇAS ARTESANAIS TIPO MISTAS, PRODUZIDAS EM MERCADOS E AÇOUGUES NO MUNICÍPIO DE TERRA ROXA (PARANÁ)**., sob orientação da Profa. Dra. EDNA TEREZA DE LIMA, que após ter inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 10 de Julho de 2019.

EDNA TEREZA DE LIMA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MARCO ANTÔNIO BACELLAR BARREIROS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SILVIA CRISTINA OSAKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RESUMO

A salmonelose é uma das principais zoonoses de grande importância para a Saúde Pública em todo o mundo, evidenciando-se pelas suas características de endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela sua dificuldade na adoção de medidas para o seu controle. O presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de linguiças mistas produzidas artesanalmente no Município de Terra Roxa - PR. Seis mercados e três açougues foram visitados e um total de 150 amostras foram coletadas entre os meses de novembro e dezembro de 2018. As amostras foram acondicionadas em suas embalagens de comercialização e transportadas ao Laboratório de Microbiologia da UFPR – Setor Palotina, em caixa térmica com gelo reciclável, devidamente identificadas quanto ao estabelecimento de origem e datas de fabricação. No laboratório foram pesados 25g de cada amostra e transferida para tubos contendo 225 mL de água peptonada tamponada 1% para homogeneização no Stomacher Lab Blender 400, por trinta segundos. Após análise microbiológica convencional, 16 amostras foram consideradas positivas para *Salmonella* spp. As amostras foram submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana pela técnica de disco-difusão, frente a sete antibióticos (Ciprofloxacina, Gentamicina, Amoxicilina+Ácido Clavulonato, Ácido Nalidíxico, Doxicilina, Amicacina e Cefalotina), em Ágar Mueller Hinton, com incubação a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação foram realizadas as leituras do halo de inibição mensurados em milímetros (mm). As amostras também foram analisadas pela Técnica da PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores presentes no gene *InvA*. Na Técnica da PCR, apenas quatro amostras confirmaram positividade. Estas foram sequenciadas e também foram submetidas à sorotipagem, cujo resultado foi de *Salmonella* Typhimurium. Trinta e dois por cento das amostras foram resistentes para Ciprofloxacina, 44 para Amicacina, 75 para Ácido Nalidíxico, 100 para Amoxicilina+Ácido Clavulonato, 50 para Gentamicina e 93 para Doxicilina e Cefalotina. A presença de *Salmonella* spp. indica contaminação da matéria-prima, portanto as linguiças do tipo mistas artesanais, precisam receber maior atenção quanto aos aspectos higiênico-sanitários de sua produção, armazenamento e comercialização. Os proprietários dos estabelecimentos foram orientados aos procedimentos corretos de manipulação, higienização e também a implementar uma rotina de trabalho.

Palavras-chaves: Resistência antimicrobiana, Alimento, Embutidos e PCR.

ABSTRAT

Salmonella is a foodborne bacterial pathogen of great relevance to global public health, due to its characteristics of endemicity, high morbidity and the difficulty in adopting measures for its control. The aim of this study is to verify the occurrence of *Salmonella* spp. in samples of handcrafted mixed sausage produced in Terra Roxa - PR. From November to December of 2018 six markets and three butcher shop were visited. A total of 150 samples were collected, which were maintained in their commercial package and transported into thermal boxes with recycle ice to the Laboratory of Microbiology of the Federal University of Parana – Palotina for analysis. All samples were identified with its origin place and date of manufacture. It was collected 25g of each sample and homogenized into 225 ml of peptone water, for 30 seconds in Stomacher Lab Blender 400. In conventional microbiological analysis, 16 samples were positive for *Salmonella* spp. All were evaluated using the antimicrobial susceptibility test by disc diffusion method for seven antibiotics (ciprofloxacin, gentamicin, amoxicillin-clavulanic acid, nalidixic acid, doxycycline, amikacin, cefalotin). This test was performed into Mueller-Hilton agar plate and incubated into 37°C for 24 hours. After the incubation period were performed readings proceed by measurement of the zones of growth inhibition around each of the antibiotic disks (millimeter). The samples were also analyzed by PCR technique using oligonucleotides primers presents at the InvA gene, and only four confirmed positivity. After sequencing and serotyping, these four samples were identified as *Salmonella* Typhimurium. The analysis of antibiotic susceptibility showed 32% resistance to ciprofloxacin, 44% to amikacin, 75% to nalidixic acid 50% to gentamicin, 93% to doxycycline and cephalothin and 100% to amoxicillin-clavulanic acid. The presence of *Salmonella* spp. indicates contamination of the raw material. Therefore, handcrafted mixed sausage need special care on the hygienic-sanitary aspects of its production, storage and commercialization. The establishment owners were instructed to do the correct procedures of manipulation, sanitation and also to implement a labor routine.

Key-Words: Antibiotic resistance; food, meat products, PCR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. CLASSIFICAÇÃO DAS LINGUIÇAS	10
3. DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA)	11
3.1 SAMONELLA SPP.	13
3.1.1 Isolamento bacteriano	15
3.1.2 Pré-enriquecimento	15
3.1.3 Enriquecimento Seletivo	16
3.1.4 Meios Seletivos-indicadores.....	16
3.1.5 Identificação Bioquímica Presuntiva (meios de triagem)	16
3.1.6 Caracterização Bioquímica Complementar.....	17
3.1.7 Identificação Antigênica	17
4. SOROTIPIFICAÇÃO	17
5. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA	17
6. TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	18
7. OBJETIVO	19
PESQUISA DE <i>Salmonella</i> spp. EM LINGUIÇAS TIPO MISTAS ARTESANAIS PRODUZIDAS EM MERCADOS E AÇOUGUES NO MUNICÍPIO DE TERRA ROXA (PARANÁ)	20
RESUMO	20
ABSTRAT	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	29
REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

O ser humano em seu desejo de armazenar alimentos buscou preservar as características dos mesmos para manter suas necessidades diárias de energia. Dessa forma surgiram os processos e tecnologias de transformação, primeiramente rudimentares e atualmente controláveis por padrões tecnológicos para manter a qualidade dos produtos (OLIVEIRA, 2005).

A carne é uma das principais fontes de proteínas, rica em vitaminas do complexo B e microminerais como ferro e zinco. Qualquer tipo de carne cumpre com os aspectos nutricionais diários, sacia e satisfaz. (OLIVO; OLIVO, 2006).

O processamento de carnes, de origem muito antiga, surgiu quando a humanidade aprendeu com o passar do tempo a trabalhar com o sal como agente de preservação. O embutido está entre as formas mais antigas de processamento, tendo variados processos de fabricação, como: secagem salga, defumação, condimentação e o cozimento (GONÇALVES, 2003).

Nos últimos anos, os embutidos alcançaram significativa expansão e alta competitividade, seu consumo tornou-se diário para boa parte da população brasileira, sendo o tipo linguiça um dos mais consumidos por causa do seu preço baixo (acessível) e seu processamento simples (CORREIA, 2008). Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2006, a produção de embutidos foi de 1.322.827 toneladas, variando de linguiças, salsichas, morcelas e outros.

Segundo o RISPOA Decreto nº 9.013, a linguiça é produto cárneo obtido de carnes moídas das diferentes espécies animais, condimentado, com adição ou não de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido a processo tecnológico específico (BRASIL, 2017).

Como o embutido é constituído basicamente de tecido muscular, tecido adiposo e água, caracteriza um alimento complexo, no qual há processos bioquímicos, químicos e físicos envolvidos como os fatores intrínsecos e extrínsecos (LEMOS; YAMADA, 2003).

Conceito dos obstáculos de Leistner: o conhecimento dos fatores intrínsecos e extrínsecos que agem sobre determinado alimento permite prever sua “vida de prateleira”, sua estabilidade microbiológica, bem como conhecer a capacidade de crescimento e/ou a produção de toxinas por microrganismos patogênicos eventualmente presentes.

Um dos fatores extrínsecos é a temperatura ambiental, pois ela é algo que afeta a multiplicação de microrganismos. Os microrganismos podem multiplicar-se em uma faixa térmica muito abrangente, com registros de multiplicação de -35°C a 90°C. Há muita

controvérsia sobre a classificação dos microrganismos de acordo com a temperatura ideal de multiplicação. A mais aceita costuma dividir os microrganismos nos seguintes grupos: psicrófilos, que multiplicam-se entre 0 e 20°C, com uma temperatura ótima entre 0° e 10°C; e psicrotróficos que subdivide em: europsicrotrófico (exemplos: *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica* e *Hafnia alvei*), entre seis e dez dias sobre as temperaturas de 0 e 7°C; já os estenopsicrotróficos (*Pseudomonas fragi* e *Aeromonas hydrophyla*), formam colônias no quinto dia na mesma faixa de temperatura. Há ainda os mesófilos, com temperatura ótima de multiplicação entre 25 e 40°C. Esses microrganismos correspondem à maioria daqueles de importância em alimentos, inclusive a maior parte dos patógenos de interesse em saúde pública (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Existem ainda outros fatores extrínsecos como, umidade relativa do ambiente, há uma correlação estreita entre a atividade de água (Aa) de um alimento e a umidade relativa de equilíbrio do ambiente (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A composição gasosa do ambiente que envolve um alimento pode determinar os tipos de microrganismos que poderão nele predominar. A presença de oxigênio favorecerá a multiplicação de microrganismo aeróbios, enquanto que sua ausência causará predominância dos anaeróbios embora haja bastante variação na sensibilidade dos anaeróbios ao oxigênio (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os fatores intrínsecos como a atividade de água (Aa), que representa a disponibilidade de água no alimento que pode ser utilizada pelos microrganismos no seu metabolismo e multiplicação. Ela define-se como sendo a relação existente entre a pressão parcial de vapor da água contida na solução ou no alimento e a pressão parcial de vapor da água pura, a uma dada temperatura. Os microrganismos têm um valor mínimo, um valor máximo e um valor ótimo de Aa para sua multiplicação. As bactérias Gram-negativas são mais exigentes que as Gram-positivas em relação à Aa necessária. A Aa varia entre 0 e 1, onde o limitante para crescimento microbiano é de 0.60 (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Atividade de água, temperatura e disponibilidade de nutrientes são interdependentes. Quanto mais próxima da temperatura ótima de multiplicação, mais larga é a faixa de Aa em que o crescimento bacteriano é possível. A presença de nutrientes também é importante, pois amplia a faixa de Aa em que os microrganismos podem multiplicar-se (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os microrganismos também têm valor mínimo, máximo e ótimo para sua multiplicação de acordo com a acidez do meio (pH). As carnes e os produtos marinhos, em função de seu pH, são altamente suscetíveis à multiplicação dos microrganismos presentes,

incluindo tanto os bolores e as leveduras como as bactérias, já que seu pH varia de 5,6 a 7,4 de acordo com o estresse que o animal sofreu *ante-mortem*. De acordo com o pH, alimentos de baixo pH são subdivididos em três grandes grupos: os alimentos de baixa acidez, que tem pH superior a 4,5; os alimentos ácidos, que têm pH entre 4,0 e 4,5 e os alimentos muito ácidos, que têm pH inferior a 4,0. O potencial de oxirredução (Eh), que é a troca de elétrons de um composto para outro, é variado nos microrganismos. As carnes que apresentam um potencial de oxirredução alto, exemplo, o músculo do animal, imediatamente após a sua morte, tem o Eh de +250mV (milivolts), porém, decorridas cerca de 30 horas, esse valor pode cair para -250mV, dando condições para multiplicação de microbiana anaeróbia. Além disso, tem a composição química do alimento e para que a multiplicação microbiana seja possível, os seguintes nutrientes devem estar disponíveis: água, fonte de energia (açúcares, alcoóis, aminoácidos e lipídios), fonte de nitrogênio, vitaminas (complexo B, biotina e ácido pantotênico) e sais minerais (sódio, potássio, cálcio e magnésio – importantes nas reações enzimáticas) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Outros fatores intrínsecos dos alimentos são os fatores antimicrobianos naturais, como os condimentos, pois contêm vários óleos essenciais com atividade antimicrobiana, tais como eugenol no cravo e na canela, alicina no alho, aldeído cinâmico na canela, alil-isotiocianato na mostarda, timol e isotimol no orégano. Existem interações entre os microrganismos, pois um microrganismo pode afetar a sobrevivência ou também ajudar a multiplicação de outro microrganismo através dos seus metabólitos, como por exemplo, alterando o pH do meio através da produção de ácido lático. Exemplo: os *Streptococcus* e os *Lactobacillus* produzem peróxido de hidrogênio, que é inibidor para muitas bactérias, entre elas *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e *Proteus* spp., e por fim a exclusão competitiva (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Com todos esses fatores que podem alterar o alimento, os embutidos são classificados de acordo com o seu processamento, propiciando assim um aumento na vida útil das carnes, bem como diversifica a oferta desse tipo de produto (VIEIRA, 1999). O processo de embutimento é basicamente introduzir a massa nos envoltórios. Esse processo pode ser realizado com máquinas manuais ou automatizado (NEWTON; LOPES, 2008).

2. CLASSIFICAÇÃO DAS LINGUIÇAS

A classificação das linguiças é realizada de acordo com a composição da matéria prima e das técnicas de elaboração, sendo alguns dos principais tipos (BRASIL, 2000):

- Linguiça Calabresa: é o produto oriundo exclusivamente de carnes suínas, curado, adicionado de ingredientes, devendo ter o sabor picante ressaltado que é característico da pimenta calabresa. Pode ser submetida ou não ao processo similar à desidratação ou cozimento, sendo a defumação opcional (BRASIL, 2000):

- Linguiça Portuguesa: é o produto obtido somente de carne suína, curado, adicionado de ingredientes, submetido à ação do calor com defumação. A forma de apresentação do produto é de uma “ferradura”, e com sabor acentuado de alho (BRASIL, 2000):

- Linguiça Toscana: é o produto cru, curado obtido exclusivamente de carne suína, adicionada de gordura suína e ingredientes (BRASIL, 2000):

- Paio: é o produto obtido de carnes suína e bovina (máximo 20%) embutida em tripas naturais ou artificiais comestíveis, curado, e adicionado de ingredientes, submetida à ação do calor com defumação (BRASIL, 2000):

A utilização de aditivos se tornou um item indispensável na alimentação moderna, sobretudo pela excelente capacidade de manter a qualidade e validade dos alimentos vendidos em supermercados (GOUVEIA, 2006).

Qualquer substância adicionada aos alimentos leva há denominação de aditivo, independentemente de qualquer consideração quanto à finalidade tecnológica ou de outro tipo. Este conceito é válido também quando os aditivos possuem certo valor nutricional, caso em que seriam melhor definidos como ingredientes, representando componentes nutritivos essenciais (PARDI, 1993).

A produção de embutidos sem cloreto de sódio é praticamente inviável, pois o sal contribui para o sabor e tem importância fundamental para os processos tecnológicos. O sal utilizado é o cloreto de sódio (NaCl) que retarda o crescimento microbiano, agindo como bacteriostático em função da redução de atividade de água (LEMOS, 2003). Além dessa atividade, o sal também ressalta o aroma dos embutidos que, combinado com as especiarias, salienta o aroma da carne. Junto com o nitrito e o açúcar, o sal é considerado a base para o processo de cura, sendo considerado um aditivo conservador (PARDI, 1996).

Os nitratos e nitritos são sais de cura conhecido mundialmente pelo termo “cura”, provocando variações no material cru, em sua formulação, processo e técnicas aplicadas

(CORREIA, 2008). Esses sais tem função conservadora, conferem sabor e cor rósea aos produtos, e apresentam características antioxidantes (SILVA, 2000; LEMOS, 2003).

A utilização do nitrato e nitrito é muito discutida, tendo em vista os riscos associados ao seu uso demasiado e algumas evidências de toxicidade. No entanto, são essenciais na prevenção do crescimento do *Clostridium botulinum*, produtor da toxina botulínica (CORREIA, 2008).

A utilização de condimentos, termo utilizado para designar os ingredientes que têm a finalidade de melhorar o sabor dos produtos processados (LEMOS, 2003). As especiarias apresentam efeito antimicrobiano, pois alguns óleos essenciais neles presentes impedem o aparecimento de microrganismo deteriorante e patogênicos. No entanto, alguns tipos de especiarias como o cravo da Índia e a noz moscada podem ser responsáveis pela redução do *shelf life*, uma vez que apresentam uma elevada carga microbiana (LEMOS, 2003; TERRA *et al.*, 2004).

3. DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano, milhões de pessoas adquirem doenças transmitidas pelo consumo de água e alimentos contaminados e, desses, aproximadamente 220 milhões de crianças menores de cinco anos adoecem anualmente por doenças diarreicas (WHO, 2018). A necessidade de grande atenção na segurança alimentar é um tema importante e a melhoria da qualidade sanitária dos alimentos diz respeito a todos os segmentos que estão envolvidos na produção e consumo deles. Certamente essa consciência irá reduzir a incidência das chamadas doenças transmitidas por alimentos (DTA) (WHO, 2018). O fornecimento de alimentos livres de riscos à saúde é realmente um desafio, e sua negligência pode ocasionar infecções e intoxicações graves e prejudiciais ao consumidor, causando desde um simples desconforto intestinal a distúrbios neurológicos e morte (MIRANDA; BARRETO, 2012).

As DTA são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Existem previsões de que o problema aumente no século 21, especialmente com as várias mudanças globais, incluindo crescimento da população, pobreza, exportação de alimentos e rações animais que influenciam a segurança alimentar internacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O número crescente de DTA pode atingir anualmente até 30% da população por ano em países desenvolvidos. Devido a esse aumento desenfreado, entidades governamentais,

indústrias e os próprios consumidores vêm se tornando mais exigentes quanto à inocuidade dos alimentos (WHO, 2015). Entre os anos de 2009 e meados de 2018 foram notificados, no Brasil, 6.809 surtos de DTA, com 120.584 pessoas doentes e, o alimento relacionado com a enfermidade foram alimentos mistos (aqueles cuja composição tem ingredientes que pertencem a grupos diferentes (como pizzas, cujos ingredientes podem incluir molho de tomate, queijo, farinha de trigo e muitos outros)). Alimentos de origem cárnea, tanto bovina quanto suína e de aves, estão relacionados em 8,72% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). O principal agente etiológico causador do surto foi a *Escherichia coli*, seguida *Salmonella* spp.

É considerado surto de DTA quando duas ou mais pessoas apresentam doença ou sintomas semelhantes após a ingestão de alimentos e/ou água da mesma origem, normalmente em um mesmo local.

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) estima que 48 milhões de pessoas ficam doentes, 128 mil são hospitalizadas e três mil morrem por causa de doenças transmitidas por alimento (CDC, 2019) No Brasil são notificados em média 700 surtos anualmente, com 13 mil envolvidos e 10 óbitos (SINAN, 2019).

Em 2019 ocorreu um surto de intoxicação alimentar nos Estados Unidos, onde 137 pessoas foram intoxicadas por *Salmonella* Carrau, onde 38 foram hospitalizadas em 10 estados diferentes, e o alimento contaminado foram melões cortados, vendidos pronto para consumo nos supermercados da região (CDC, 2019).

No Estado de Paraná, durante o período de dez anos (2009 – 2018), de acordo com as informações do SinanNet atualizado em 06 de junho de 2016, foram notificados 631 casos de investigação de doenças transmitidas por alimentos. Embora, no decorrer dos anos tenham sido implementadas ações mais efetivas de vigilância epidemiológica, ainda assim não houve aumento significativo nas notificações em 2019 (SINAN, 2019). Apesar da relação positiva entre as doenças de origem alimentar com a ingestão de água e alimentos contaminados, a precariedade de informações e a falta de notificações imediatas comprometem a real dimensão do problema (WELKER, *et al.*, 2010). No Brasil, os surtos notificados, em geral, restringem-se àqueles que englobam um maior número de pessoas ou quando os sintomas da doença são prolongados. Estas situações não geram apenas prejuízos diretos para os doentes, mas também acarreta prejuízo com perda da produção, saúde coletiva e recursos hospitalares (SPRICIGO *et al.*, 2008).

A Vigésima Regional de Saúde é uma instância administrativa do Estado, cuja a base é em Toledo, ela coordenada as ações de saúde de 18 municípios, sendo Terra Roxa um deles,

durante período de 10 anos e mais os seis meses do atual ano (2019) ocorreram somente nove notificações nessa Regional.

Os entraves (subnotificação, sintomatologia não específica e com cura espontânea e demora no diagnóstico laboratorial) revelam que o perfil epidemiológico das DTA no Brasil ainda é pouco conhecido. Alguns estados ainda não possuem dados referentes aos agentes etiológicos e alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos. Contudo, sabe-se que o surgimento das DTA tem como principal consequência o não atendimento das regras básicas de higiene durante o preparo e conservação dos alimentos. Logo, é possível evitar a maioria das doenças de origem alimentar se comportamentos preventivos forem adotados em toda a cadeia produtiva dos alimentos (LEITE; WAISSMANN, 2006).

3.1 *SAMONELLA* SPP.

O gênero *Salmonella*, foi nomeado pelo USDA veterinário bacteriologista Daniel e Salmon (1850-1914), e consiste em mais de 2.500 sorovares distintos, sendo que os sorotipos são nomeados de acordo com o local de onde foram isolados inicialmente e de acordo com o esquema Kauffmann-White (GAST, 2003).

Existem apenas duas espécies de *Salmonella*, a *S. enterica* e *S. bongori*, que são divididas em oito grupo (BOYD, et al., 1996). A primeira é constituída por 6 subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (POPOFF et al., 2004). Como mais de 2.500 sorotipos, sendo eles a base da nomenclatura da *Salmonella*, entretanto apenas 200 são associados com doenças em humanos (FORSYTHE, 2013).

Os tipos sorológicos são divididos de acordo com a especificidade antigênica, que é caracterizada por antígenos somáticos (O), capsulares (vi) e flagelares (H) (EWIG, 1986).

Samonella spp. são bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, não formam endósporos e tem forma de bastonetes curtos, sendo que a maior quantidade de sorotipos encontrados são móveis e possuem flagelos peritriquios, apenas a *S. Gallinarum* e *S. Pullurom*, não são móveis (FORSYTHE, 2013).

Esses bacilos apresentam crescimento ótimo à 37°C e produzem gás a partir da glicose (exceto *S. Typhimurium*), sendo capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono (FRANCO; LANDGRAF, 1996). A maior parte das salmonelas são capazes de fermentar carboidratos e produzir gases e ácidos, além de produzirem sulfeto de hidrogênio (H₂S), não produzem a enzima oxidase e são capazes de produzir a enzima catalase (RUSSEL, 2012).

A temperatura máxima de crescimento dessa bactéria é de 46°C, desta forma a *Salmonella* spp. cresce bem em intestinos de humanos, de outros mamíferos e espécies de aves (JUNEJA *et al.*, 2009).

São destruídas a uma temperatura de 55°C por uma hora ou de 15 a 20 minutos a uma temperatura de 60°C. A resistência a antibióticos foi observada em 1958 por Huey e Edwards, que estudaram amostras de *Salmonella* resistentes as tetraciclinas. No ano de 1962, cepas de *Salmonella* Typhimurium mostraram-se resistentes a ampicilinas, estreptomicina e sulfonamidas (GAST, 1997).

Salmonella spp. está distribuída na natureza e inicialmente é um patógeno de aves domésticas, bovinos, suínos, pássaros, ovinos, focas, primatas não humanos, lagartos e outros répteis (KONEMAN *et al.*, 1997).

A epidemiologia é complexa visto que essa bactéria pode estar na cadeia produtiva de aves, e a transmissão vertical, via ovo desencadeia o nascimento de aves infectadas. Há também o envolvimento horizontal, com a contaminação do ambiente e de ração, além da existência de diferentes espécies animais que contribuem como reservatório. A prevenção e controle da *S. Enteritidis* (SE) constitui uma tarefa árdua, mas extremamente necessária. As medidas mais usadas para a redução da bactéria nas aves e no ambiente constituem-se em: Programa de biossegurança: aquisição de aves, rações e matérias-primas livres de *Salmonella*, uso de ácidos orgânicos e peletização das rações, administração de produtos de exclusão competitiva e imunização com vacinas (STERZO *et al.*, 2007).

A *Salmonella* também tem sido isolada de muitos tipos de frutas e vegetais crus, incluindo brotos de feijão, melões, sucos de laranja não pasteurizados, suco de maçã e tomates, portanto é de extrema importância a prática de higiene durante a manipulação desses produtos para reduzir a contaminação (BIDOL, *et al.*, 2007; FORSYTHE, 2013).

As notificações e os registros epidemiológicos são importante fonte de informações para que os órgãos competentes de fiscalização e controle possam estimar quais os patógenos e grupos de alimentos possivelmente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares, como por exemplo, que planteis de suínos vem apresentando alta taxa de *Salmonella* que antigamente não era presente, dessa forma acende-se um alerta de saúde pública (FORSYTHE, 2013).

Salmonella geralmente causa as seguintes doenças em seres humanos: gastroenterites (*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*), febre entérica (*S. Typhi* e *S. Paratyphi*), e as doenças sistêmicas invasivas (*S. Choleraesuis*). As características dos sintomas das doenças de origem alimentar causada pelo gênero *Salmonella* são: diarreia, náusea, dor abdominal, febre branda, calafrios e algumas vezes vômitos, cefaleia e fraqueza (FORSYTHE, 2013).

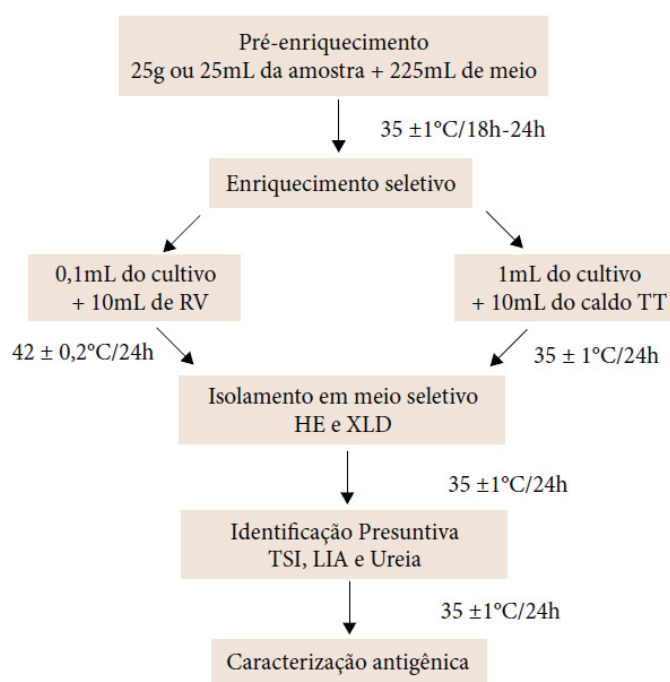
Um estudo feito na Holanda por Van Duijkeren *et al.* (2003), comparou a suscetibilidade de sorovares de *Salmonella* isolados entre 1984-1989 com isolados do período entre 1996-2001, e a multirresistência dos isolados em humanos variou de 3,2% a 45%, em suínos a variação foi de 3,9% para 41,7% e em aves foi de 1,8% para 25,2%, o sorovar Typhimurim foi o que evidenciou maiores percentuais de resistência.

3.1.1 Isolamento bacteriano

3.1.2 Pré-enriquecimento

As salmonelas podem estar presentes nos alimentos em pequenas quantidades e, geralmente, sofrem os efeitos resultantes do processamento e do armazenamento. Necessitam, portanto, de pré-enriquecimento em meios não seletivos para sua recuperação. A Água Peptonada a 1,0% tamponada e o Caldo Lactosado são comumente usados, mas outros meios, tais como Triptona de soja e Caldo Nutriente, podem ser empregados.

O diagnóstico da *Salmonella* é realizado da seguinte forma:



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011.

3.1.3 Enriquecimento Seletivo

O enriquecimento seletivo determina aumento contínuo de *Salmonella* spp, restringindo a proliferação da microbiota acompanhante. Devido à utilização dos diferentes agentes inibitórios adicionados aos meios, estes também diferem em sua seletividade e aplicação específica. Diferentes tipos de inibidores têm sido propostos para enriquecimento seletivo de salmonelas, sendo a Bile, o Tetracionato, o Selenito e corantes, como o Verde Brillante e o Verde Malaquita, os mais usados. Esses inibidores são incorporados aos meios, isolados ou em combinação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

3.1.4 Meios Seletivos-indicadores

No esquema de diagnóstico das enterobactérias, os meios seletivos indicadores, de natureza sólida, desempenham função primordial para o isolamento de diferentes membros dessa família. Todos esses meios objetivam a diferenciação de *Salmonella* spp. de outras bactérias, em função de suas propriedades inibitórias e do aspecto macroscópico das colônias.

Esses meios são baseados na incapacidade das salmonelas em fermentarem a lactose e, em alguns casos, outros substratos, tais como a sacarose e a salicina, bem como a capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio. Vários meios, tais como o Ágar Verde Brillante (a característica morfológica da colônia é lisa, convexa, circular, brilhante e com coloração transparente devido à ausência de sulfeto de hidrogênio e a região onde a multiplicação bacteriana fica rosa), o Ágar Entérico de Hektoen, Ágar Xilose Lisina Desoxicolato, Ágar Salmonella-Shigella e o Ágar Sulfito de Bismuto, são indicados nos procedimentos aprovados por diferentes órgãos reguladores para o isolamento da *Salmonella* a partir de alimentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). O ágar Mac conkey é ligeiramente seletivo, uma vez que a concentração de sais biliares e cristal de violeta, que inibe a multiplicação de bactérias Gram-positivas. As colônias de microrganismo lactose negativa formam colônias transparentes (MERCK, 1990).

3.1.5 Identificação Bioquímica Presuntiva (meios de triagem)

Uma vez selecionadas colônias sugestivas nos meios indicadores seletivos, estas serão transferidas para meios de triagem, tais como Ágar Ferro Triplo Açúcar – Ágar TSI, Ágar dois açúcares ferro (Kligler – KIA), Ágar Lisina Ferro – LIA, meio de Costa e Vernin – CV, meio IAL (modificação do meio de Rugai e Araújo), Ágar Motilidade-Indol-Lisina – MILi, Ágar Motilidade-Indol-Ornitina – MIO e meio EPM – Escola Paulista de Medicina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

3.1.6 Caracterização Bioquímica Complementar

Embora seja possível uma identificação preliminar, com base na morfologia colonial e nas reações bioquímicas, nos diferentes meios indicadores seletivos e de triagem, a identificação de membros da família Enterobacteriaceae requer a utilização de provas bioquímicas complementares. Entre as provas preliminares, destacam-se a detecção da enzima citocromo-oxidase e a redução do nitrato a nitrito, características intrínsecas da família (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

3.1.7 Identificação Antigênica

Determinadas características bioquímicas específicas podem ser observadas em alguns sorotipos, como:

Salmonella Typhi: ausência de gás em glicose, produção reduzida de H₂S, lisina e ornitina descarboxilase positiva e utilização do citrato de Simmons negativas.

Salmonella Paratyphi: produção de gás em glicose, ornitina descarboxilase positiva, produção de H₂S, lisina descarboxilase e citrato de Simmons negativas. Entretanto, a confirmação do sorotipo somente poderá ser dada por meio da identificação antigênica conclusiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

4. SOROTIPIFICAÇÃO

Essa técnica é baseada nas diferentes combinações dos antígenos capsulares, somáticos e flagelares, esses são responsáveis pela classificação da *Salmonella* em sorotipos. Para avaliar quais os antígenos, são utilizados anticorpos específicos para as estruturas antigênicas presentes na superfície celular da bactéria. Técnica muito importante nas indústrias como estudo preliminar, para analisar a correlação entre os isolados ao longo da cadeia produtiva, fornecendo indícios de fontes de contaminação. Esse método tradicional fornece informações essenciais, com certas limitações, o que faz necessário o uso de outras técnicas de tipificação em conjunto, para melhorar a caracterização das cepas analisadas (MORREIRA, 2012).

5. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

É uma técnica baseada na resistência ou suscetibilidade da bactéria a antimicrobianos, no caso específico aos antibióticos. O princípio é a utilização de discos de antimicrobianos em

uma placa previamente inoculada e incubada com as bactérias. Avalia-se se houve ou não crescimento da bactéria ao redor de cada disco e se classifica então as cepas como sendo ou não suscetíveis aos antibióticos testados. É variável, pois o genoma bacteriano é extremamente dinâmico e está sujeito as diferentes pressões seletivas. A maioria dos fatores que determinam a resistência são carreados por elementos móveis como os plasmídeos, transposons e integrons e na ausência de pressão seletiva, estes elementos podem ser perdidos.

Por isso, linhagens diferentes podem desenvolver padrões de resistência semelhantes, ao mesmo tempo em que isolados pertencentes à mesma linhagem podem diferir no perfil de sensibilidade.

A avaliação desse perfil é muito utilizada como marcador epidemiológico, sendo uma ferramenta útil na identificação da emergência de linhagens resistentes, ainda que não permita identificar a sorovariedade (GUIMARÃES, 2010).

6. TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

É capaz de identificar o microrganismo a partir do seu material genético. O princípio deste método é replicar uma sequência alvo de DNA específica. A enzima DNA polimerase é a responsável pela amplificação e multiplicação da fita molde (MALORNY *et al.*, 2009). Juntamente com o DNA a ser amplificado adicionam-se os seguintes reagentes: a enzima termoestável taqDNA-polimerase; dois oligonucleotídeos iniciadores, também conhecidos como primers, desenhados para serem complementares as sequências específicas da fita dupla e quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (SILVA *et al.*, 2011).

Inicialmente o ácido desoxirribonucléico (DNA) é submetido a desnaturação, os iniciadores anelam-se à fita de DNA complementar e a taq polimerase organiza os desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) sintetizando o fragmento da dupla fita desejado (MALORNY *et al.*, 2009). Estas etapas repetem por 30 ciclos, resultando em milhares sequências do material genético desejado (KUMAR *et al.*, 2008).

A reação ocorre em um equipamento denominado termociclador, é onde ocorre a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (GANDRA *et al.*, 2008). Os amplicons, produtos da PCR, são submetidos a eletroforese em gel de agarose, é nesta etapa que se tem a separação desses produtos de amplificação de acordo com a massa molecular. Os produtos são corados com intercalantes de DNA, tais como SYBR® safe, brometo de etídio ou GelRed™ e visualizados sob luz ultra-violeta (MALORNY *et al.*, 2009).

Para a bactéria salmonela que é um patógeno intracelular facultativo o primeiro ciclo dela e invadir as células epiteliais do intestino, para essa ação ela possui um gene denominado *invA*, esse gene que é repetido milhares de vezes na técnica de PCR (GALAN *et al.*, 1992).

O gene *InvA* da *Salmonella* contém sequências únicas e tem provado um alvo potencial da PCR (DARWIN; MILLER, 1999).

7. OBJETIVO

A presente dissertação apresenta-se em capítulo único no formato de artigo a ser submetido ao Journals Acta Tropica.

PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM LINGUIÇAS TIPO MISTAS ARTESANAIS PRODUZIDAS EM MERCADOS E AÇOUGUES NO MUNICÍPIO DE TERRA ROXA (PARANÁ)

Renato de Oliveira Pereira^{1*}, Cristiane Carvalho Mendes¹, Vinicius Dahm¹, Ricardo Babinski Bregonde¹, Silvia Cristina Osaki¹, Edna Tereza de Lima¹

1. Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina – PR. * renato7pereira@gmail.com

RESUMO

A salmonelose é uma das principais zoonoses de importância para Saúde Pública no mundo, evidenciando-se pelas suas características de endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade para o seu controle. O presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de linguiças mistas produzidas artesanalmente no Município de Terra Roxa - PR. Foram visitados seis mercados e três açougues, totalizando 150 amostras coletadas entre novembro e dezembro de 2018, sendo acondicionadas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia da UFPR – Setor Palotina. Após análise microbiológica convencional, 16 amostras foram positivas para *Salmonella* spp. e posteriormente submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana pela técnica de disco-difusão e à PCR. Durante as coletas foram aplicados questionários epidemiológicos para verificar a presença de fatores de risco. As amostras foram 100% resistentes a amoxicilina + ácido clavulonato e o antibiótico com menos resistência foi a ciprofloxacina. Na técnica da PCR, apenas quatro amostras foram positivas. Estas foram submetidas ao sequenciamento e à sorotipagem para confirmação, cujo resultado foi *Salmonella* Typhimuriun. Nenhum fator de risco analisado foi significativo. A presença de *Salmonella* spp. indica contaminação da matéria-prima, portanto as linguiças do tipo mistas artesanais, precisam receber maior atenção quanto aos aspectos higiênico-sanitários de sua produção, armazenamento e comercialização. Os proprietários dos estabelecimentos foram orientados sobre a higienização das mãos e dos utensílios e também a implementar uma rotina de trabalho.

Palavras-chaves: Resistência antimicrobiana, Alimento, Embutidos e PCR.

DETECTION OF *Salmonella* spp. IN HANDCRAFTED MIXED SAUSAGE PRODUCED IN MARKETS AND BUTCHERS OF TERRA ROXA (PARANÁ)

ABSTRAT

Salmonella is a foodborne bacterial pathogen of great relevance to global public health, due to its characteristics of endemicity, high morbidity and extreme difficulty of control. The aim this study is to verify the occurrence of *Salmonella* spp. in samples of handcrafted mixed sausage produced in Terra Roxa - PR. From November to December of 2018 six markets and three butchers shop were visited. A total of 150 samples were collected, which were properly conditioned and transported to the Laboratory of Microbiology UFPR – Palotina for analysis. In conventional microbiological analysis, 16 samples were positive for *Salmonella* spp. The positive samples were evaluated using the antimicrobial susceptibility test by disc diffusion method and PCR. At the time of sample collection, an epidemiological questionnaire was applied to evaluate risk factors. The analysis of antibiotic susceptibility showed 100% of resistance to amoxicillin-clavulanic acid. The lowest resistance evidenced was to ciprofloxacin (32%). At PCR technique, only four samples were positives. After sequencing and serotyping, these four samples were identified as *Salmonella* Typhimurium. No risk was significant. The presence of *Salmonella* spp. indicates contamination of the raw material. Therefore, handcrafted mixed sausage need special care on the hygienic-sanitary aspects of its production, storage and commercialization. The establishment owners were instructed to do the correct procedures of manipulation, sanitation and to implement a labor routine.

Key-Words: Antibiotic resistance; food, meat products, PCR.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os embutidos alcançaram significativa expansão e alta competitividade, seu consumo tornou-se diário para boa parte da população brasileira, sendo a linguiça um dos mais consumidos pelo seu baixo preço (acessível) e seu processamento simples (Correia, 2008). Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2006, a produção de embutidos foi de 1.322.827 toneladas, variando de linguiças, salsichas, morcelas e outros.

Como o embutido é constituído basicamente de tecido muscular, tecido adiposo e água, caracteriza um alimento complexo, no qual há processos bioquímicos, químicos e físicos envolvidos como os fatores intrínsecos e extrínsecos (Lemos e Yamada, 2003).

As interações simultâneas entre os fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos permite prever sua “vida de prateleira”, sua estabilidade microbiológica, bem como conhecer a capacidade de crescimento e/ou a produção de toxinas por microrganismos patogênicos eventualmente presentes (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Os alimentos são fonte de cerca de 1 milhão de agentes causadores de doenças, sendo que a maioria é causada por bactérias, especialmente a *Salmonella* spp. As infecções alimentares representam um grande problema para Saúde Pública. Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) a salmonelose afeta aproximadamente 1,2 milhões de pessoas, hospitaliza 23.000 e causa óbito de 450 por ano nos Estados Unidos da América (EUA). O FoodNet relata que a incidência anual de infecção causada por *Salmonella* spp. nos EUA foi de 15.2 doentes por 100.000 habitantes (CDC, 2019).

Conforme a Legislação Brasileira vigente, *Salmonella* spp. deve estar ausente em qualquer tipo de alimento, já que a maioria dos sorovares desse gênero é patogênico ao homem e apresenta variações na sintomatologia decorrentes da variação no mecanismo de patogenicidade, idade e da resposta imune do hospedeiro. Entretanto, surtos de salmonelose são reportados em todo país. Os sorovares mais comuns de *Salmonella* que causam infecção em humanos são: Enteritidis, Typhimurium, Newport e Javiana. Esses sorotipos respondem por cerca da metade dos isolados confirmados em cultura de diversos laboratórios de saúde pública (Robinson, 2013).

No Brasil as notificações são realizadas apenas em surtos que envolva um maior número de pessoas ou quando a duração dos sintomas é mais duradoura. Entre os anos de 2009 e meados de 2018 foram notificados, no Brasil, 6.809 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), com 120.584 pessoas doentes e, o principal alimento relacionado com a

enfermidade foram alimentos mistos. Alimentos de origem cárnea, tanto bovina quanto suína e de aves, estão relacionados com 8,72% dos casos. O principal agente etiológico causador do surto foi a *Escherichia coli*, seguida por *Salmonella* spp. (Ministério da Saúde, 2019).

A metodologia analítica para a detecção de *Samonella* spp. em amostras de alimentos e água é definida por uma Instrução Normativa SDA - 62 de 2003, que preconiza o método microbiológico convencional como padrão (Brasil, 2003). Esta norma padroniza as fases de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo cistina, isolamento em meio sólido, seleção de colônias suspeitas e sorologia. O resultado é considerado positivo quando as culturas apresentam reações típicas as provas bioquímicas. E conforme a resolução, quando os resultados apresentarem reações inespecíficas, as amostras devem ser identificadas por métodos moleculares ou remetidas para uma Instituição de referência. O resultado final de uma amostra positiva pode demorar entre cinco e dez dias para seu desfecho.

Diante dos fatos o presente estudo teve como objetivo verificar a presença de *Salmonella* ssp. em linguças mistas produzida artesanalmente no Município de Terra Roxa-PR.

2.MATERIAL E MÉTODOS

Entre os meses de novembro e dezembro de 2018, foram coletadas 150 amostras (200g cada), de linguças curadas mistas (carne bovina e suína), produzidas e vendidas nos mercados e açougues no município de Terra Roxa - Paraná, Brasil. As amostras foram pesadas e acondicionadas em suas embalagens de comercialização e transportadas ao Laboratório de Microbiologia da UFPR - Setor Palotina, em caixa térmica com gelo reciclável, devidamente identificadas quanto ao estabelecimento de origem e datas de fabricação. A pesquisa foi realizada em parceria com o Órgão da Vigilância Sanitária do Município de Terra Roxa - PR. Os proprietários concordaram em participar da pesquisa, os quais receberam o resultado final da presença ou ausência para *Salmonella* ssp. dos seus respectivos produtos analisados, assim como recomendações para a melhoria da qualidade do alimento.

As amostras foram pesadas (25g) e transferidas para sacos plásticos estéreis contendo 225mL de Água Peptonada tamponada a 1% e foram homogêneas no homogêneo Stomacher Lab Blender 400 por 60 segundos, e incubadas a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, alíquotas de 1mL foram transferidas para tubos contendo 10mL de caldo Selenito (Difco®) e tubos com 10mL de caldo Tetrionato (Difco®), estes foram incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente com auxílio de alça de platina, as

culturas foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Mac Conkey (MAC - Difco®) e Ágar Verde Brillante (AVB - Difco®). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas (Andrews *et al.*, 2001).

Os testes de carboidratos para confirmar a presença de *Salmonella* foram realizados após 24 horas, onde as colônias características de *Salmonella* spp. foram repicadas em tubos de ensaio contendo o Ágar Citrato de Simmos (Difco®), Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI – Difco®) e caldo Ureia (Difco®), com incubação a 37°C por 24 horas. As amostras com leitura positiva para *Salmonella* spp. foram cultivadas em Ágar Lysine Iron e carboidratos como: Arginina; Adonitol, Rafinose, Lactose, D-Glicose anidra, Manitol e Maltose, os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas.

As 16 amostras positivas foram submetidas à Técnica da PCR para confirmação da espécie. Para realização da técnica da PCR foi realizada a repicagem das colônias para tubos contendo 5mL de Caldo de Infusão Cérebro e Coração (BHI), com incubação a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foram transferidos 400µL da cultura para ependorff. Para a extração do DNA, 400µL de cada um dos caldos foi centrifugado a 4.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o pellet (sedimento) foi ressuspenso em 1mL de solução tampão de fosfato (PBS –NaCl8g; NaH₂PO₄ 1,15g; K₂HPO₄ 0,2g KCl 0,2g – para 100mL de água destilada, pH 7,4), homogeneizado e centrifugado a 4.000g por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi novamente desprezado e o pellet ressuspenso em 300µL de água livre de nuclease. As amostras foram fervidas a 100°C por 15 minutos. Logo após esse tempo houve novamente a centrifugação a 5.000g por 10 minutos. Para finalização o sobrenadante contendo o DNA extraído foi retirado e armazenado em tubos de microcentrífuga 0,5mL para a realização da PCR.

As reações foram feitas por PCR simples, contendo GoTaq® (Cellco®) 1X, 1,25µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3 µL de DNA extraído, água *free* DNA q.s.p 25µL. A sequência dos primers *InvA1* 5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC 3' e *InvA2* 5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG G 3' 284pb (Invitrogen Custom Primers®) (Kuba, 2008). Como controle positivo foi utilizada uma amostra de campo de *Salmonella* Typhimurium - ATCC 14028 e como controle negativo foi utilizada água Dnase free - Milli-Q Plus. A reação de PCR foi feita de acordo com Kuba (2008). Os produtos amplificados observados em gel de agarose a 1,0%, utilizando o corante *Brometo de etídio*.

Os produtos da PCR foram sequenciados no Laboratório ACTgene no estado do Rio Grande do Sul. Os resultados do sequenciamento foram analisados pela ferramenta de alinhamento BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

A sorotipagem foi realizada no Centro de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacteriana – FIOCRUZ, com o envio do material (cultivo de *Salmonella* spp.) em tubos contendo Ágar Mueller-Hinton.

O perfil de sensibilidade e resistência das amostras (16) das seguintes drogas antimicrobianas: Ciprofloxacina (10µg), Amicacina (10µg), Ácido Nalidíxico (5µg), Amoxicilina+Ácido Clavulonato (30µg), Gentamicina (5µg), Doxicilina (10µg) e Cefalotina (30µg), foi verificado utilizando a técnica de disco-difusão. Cada amostra foi transferida para tubos contendo 5mL de caldo Mueller-Hinton e incubadas por seis horas à temperatura de 37°C. Posteriormente as culturas foram semeadas com auxílio de *swabs* estéreis em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Para completa absorção da cultura, as placas foram deixadas em repouso durante cinco minutos. Em seguida, os discos foram depositados sobre a superfície de cada placa com auxílio de pinça estéril, e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, realizou-se a leitura dos halos de inibição formados ao redor dos discos, mensurados em milímetros (mm) com auxílio de uma régua. Os resultados foram analisados com auxílio de tabela padrão como sensível, intermediário e resistente (CLSI / NCCLS, 2003).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 150 amostras processadas, 10,66% foram positivas para *Salmonella* spp. e, portanto, consideradas impróprias para consumo. Todas as amostras contaminadas foram oriundas de mercados, totalizando 115 amostras, correspondendo uma percentagem de contaminação de 13,91%. Todas as 35 amostras provenientes de açougues foram negativas para *Salmonella*.

A frequência de isolamento de *Salmonella* spp. em alimentos é bastante variável entre regiões de um mesmo país, além de variar entre países também esses pesquisadores encontram de 7,5% e 24, 8% em linguças de frango (Escartin *et al.*, 1999, Murmann *et al.*, 2009, Spricigo *et al.*, 2008).

Em estudo realizado por Tessmann *et al.* (2001) foram encontradas 20% das amostras de linguça contaminadas pela *Salmonella* spp. Silva *et al.* (2002) verificaram 17,8% de contaminação. Esses resultados são superiores aos encontrados no presente estudo, mas Daguer *et al.* (2011), encontraram 3,8% de e Adamin *et al.* (2015), apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. em 3% das amostras de linguças, ambos com valores abaixo do encontrado no presente trabalho, os resultados também foram diferentes por causa da geografia do local e período climático.

A contaminação interna da linguiça pode ter origem variada, podendo ocorrer durante toda a cadeia produtiva, no transporte e no abatedouro, pelo contato direto com o conteúdo intestinal durante a linha de abate e processamento, ou ainda devido ao estresse que debilita o sistema imune dos animais e possibilita o fluxo do enteropatógenos para os tecidos. Também o excesso de resíduo na bancada, e a falta de higienização regular dos colaboradores, corroboram com a contaminação cruzada (Cê, 2016).

Nesta pesquisa foram encontradas 16 amostras positivas para *Salmonella* spp., por meio da metodologia convencional para isolamento bacteriano, as quais foram processadas pela (PCR).

Analisando o perfil de resistência e sensibilidade antimicrobiana das 16 amostras testadas, foi verificado que a Ciprofloxacina apresentou maior percentual de sensibilidade, enquanto Amoxicilina + Ácido Clavulonato 100% de resistência (Tab 1).

Tabela 1 – Percentual de resistência e sensibilidade dos antibióticos das 16 amostras positivas de *Salmonella* spp.

Antibióticos	Resistência %	Sensibilidade %
Ciprofloxacina	32%	68%
Amicacina	56%	44%
Ácido Nalidíxico	75%	25%
Amoxicilina+Ácido Clavulonato	100%	0%
Gentamicina	50%	50%
Doxicilina	93%	07%
Cefalotina	93%	07%

Esses dados são divergentes ao encontrado pelos pesquisadores Souza *et al.* (2010), que encontraram 100% de sensibilidade a amoxicilina+ácido clavulonato e gentamicina, 95% a ciprofloxacina e 97% ao ácido nalidíxico.

A resistência bacteriana é um assunto amplamente estudado, principalmente, quando a doença causada pelo agente bacteriano tem alto potencial de endemicidade. O consumo indiscriminado de antimicrobianos torna-se um dos principais fatores determinantes desta resistência, principalmente em locais onde a ocorrência do agente/doença é frequente. De acordo com Gellin *et al.* (1989), o uso indevido de drogas antimicrobianas em animais resulta no aumento da pressão seletiva para linhagens bacterianas multirresistentes da microbiota

normal. No presente trabalho 16 amostras foram consideradas multirresistentes (Tab. 2), uma vez que apresentaram resistência a pelo menos três ou mais classes de antibióticos diferentes.

Tabela 2 – Multirresistência aos antibióticos frente as 16 amostras positivas de *Salmonella* spp.

Antibióticos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Ciprofloxacina</i>	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
<i>Gentamicina</i>	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>Amoxicilina + cl</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Ac. Nalidixico</i>	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
<i>Doxiciclina</i>	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
<i>Amicacina</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S
<i>Cefalotina</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R

R (resistência) e S (sensibilidade).

A observação desta resistência suscita maior rigor no monitoramento da resistência antimicrobiana, pois esta ação é necessária e fundamental para fins de vigilância e controle da doença.

O uso indiscriminado e inadequado de antibióticos, tanto em homens quanto em animais, tem emergido como problema em saúde em diversos países, já que a pressão seletiva destes fármacos sobre bactérias patogênicas em animais também influencia o perfil de sensibilidade de bactérias virulentas ao homem, por troca de plasmídeos, principal mecanismo de resistência bacteriana (Alecrim *et al.*, 2002).

Os resultados encontrados são semelhantes aos descritos por Chaslus-Dancla e Millemann (1999), quando descreveram a resistência de *Salmonella* Enteritidis aos β -lactâmicos e tetraciclina. Acrescentaram que pesquisas realizadas identificaram diferença entre as *Salmonellas* de origem humana e não-humana, sendo as de origem humana mais frequentemente resistentes às penicilinas e as não-humana aos β -lactâmicos e tetraciclina. Concordância também ocorreu com os resultados e relatos de Saeed e Nair (1999) que demonstraram a resistência, especialmente da *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg, a um ou mais antibióticos aumentada consideravelmente na década passada, na Europa.

Na PCR somente quatro amostras foram confirmadas na amplificação do fragmento de DNA, com tamanho esperado de 284pb (Figura 1). Os primers escolhidos estão presentes no gene *invA*, o qual está envolvido na transcrição de proteínas relacionadas à invasão celular.

Ranh *et al.*, (1992), ao realizar ensaios de especificidade e seletividade com iniciadores derivados deste gene, testaram 630 amostras do gênero *Salmonella* e 142 amostras de outros microrganismos, incluindo 21 gêneros, e verificaram amplificação em todas as amostras de DNA de *Salmonella*, exceto *S. Litchfield* e *S. Senftenberg*. Conforme os autores, a aparente ausência do gene *InvA* nestes sorovares sugere que estes organismos não seriam invasivos, ou possuiriam caminhos alternativos de penetração celular, com potencial patogênico ainda desconhecido. Para Stone *et al.* (1994), uma associação de primers derivados dos genes *InvA* e *InvE* eliminaria a possibilidade de ocorrência de falsos-negativos, melhorando a especificidade da PCR. Ainda, Ranh *et al.* (1992), constataram bandas de amplificação inespecífica em 33 microrganismos não-salmonela. Stone *et al.* (1994), observaram produtos amplificados em amostras de DNA de *Yersinia* e *Edwardsiella*, mas com padrões de bandas em gel de agarose facilmente distintos das 47 amostras de diversos gêneros de *Salmonella* analisadas. Estes autores sugerem o emprego de técnicas de hibridização para confirmação dos resultados produzidos por PCR.

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando os produtos de amplificação de fragmento gênico de *Salmonella* spp por PCR. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (284pb). MM: Marcador Molecular. Canaleta 1: Controle Positivo; 3 a 18: amostras de campo; 19: Controle negativo



Os produtos da PCR positivos para *Salmonella* spp. e um produto de uma banda inespecífica foram enviados para sequenciamento da área amplificada para confirmação. O sequenciamento do BLAST resultou em quatro amostras positivas para *Salmonella*

Typhimurium e o da banda inespecífica na PCR sequenciou *Morganella morganii*, uma bactéria natural da microbiota intestinal que não é patogênica, mas pode produzir histamina que causa intoxicação em seres humanos. Essa análise confirma a amplificação do gene *InvA* comum para esse sorotipo.

As quatro amostras positivas para *Salmonella* ssp. na PCR, foram encaminhadas para sorotipagem, onde foi possível identificar e confirmar de acordo com o resultado do sequenciamento, dois sorotipos de *Salmonella* Typhimurium e uma subespécie entérica.

A ocorrência de resistência múltipla e cruzada também denota a necessidade de adoção responsável de antimicrobianos em Medicina Veterinária e Medicina Humana.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, conclui-se que as linguiças artesanais produzidas nos mercados de Terra Roxa estado do Paraná estão fora dos padrões exigidos pela legislação, dessa forma coloca em risco a saúde da população, uma vez também que os resultados das resistências aos antimicrobianos foram evidenciados.

REFERÊNCIAS

ADAMI, F. S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de linguiças e queijos. Caderno pedagógico, Lajeado, v. 12, n. 1, p. 46-55, 2015.

ALECRIM, W.D.; LOUREIRO, A.C.S.P.; MORAES, R.S. Febre tifóide: recaída por resistência antimicrobiana. Relato de caso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.35, p.661-663, 2002.

ANDREWS, W. H.; FLOWERS, R. S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J. S. *Salmonella*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K.; ASSOCIATION, A. P. H. (Ed). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association, 2001.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializar os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.

CÊ, E.R.; Influência das etapas do processo de abate de suínos na prevalência de patógenos e níveis de microrganismos indicadores de qualidade e higiene. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Londrina. 2016.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella>>. Acessado em: 05 de Abr. 2019.

CHASLUS-DANCLA, E., MILLEMANN, Y. Rational approach to the choice of molecular markers applicable to the tracing of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. In: AEED, A.

M. Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals – epidemiology, pathogenesis and control. 1.ed. Ames: Iowa State University Press, 141-151, 1999.

CLSI/NCCLS - Padronização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos por disco difusão. Disponível em: < http://www.sbmicrobiologia.org.br/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acessado em: 26 Jan. 2019.

CORREIA, L. M. M. *Multiplificação de microbiota autóctone e de Staphylococcus aureus inoculado em linguiças frescas produzidas com diferentes concentrações de sais de cura: um estudo em Curitiba*. 2008. 85 f. Dissertação (Pós Graduação em Tecnologias de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

DAGUER, H. et al. Qualidade de produtos cárneos fabricados sob inspeção federal no estado do Paraná. *Ciência Animal Brasileira*, v.12, n.2, p.359-364, 2011.

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

GELLIN, G.; LANGLOIS, B.E.; DAWSON, K.A. Antibiotic resistance of gram-negative enteric bacteria from pigs in three herds with different histories of antibiotic exposure. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.55, p.2287-2292, 1989.

GOODING, C.M., CHOUDARY, P.V. Comparison of different primers for rapid detection of Salmonella using the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*. 13,341-347, 1999.

IBGE, 2006 – Pesquisa Industrial Anual 2006, PIA-Produto. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/industria/pia/produtos/produto2006/piaproducto2006.pdf>. Acessado em: 02 de Jan. de 2019

LEMONS, A. L. S.; YAMADA, E.A. Princípios do processamento de embutidos cárneos. Campinas: CTC do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, 2003.

Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>>. Acessado em 02 de Fev. 2019

MÜRMAN L., SANTOS M. C., CARDOSO M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. *Food Control*, Guildford, v 20, n. 3, p. 191-195, 2009.

RAHN, K., De GRANDIS, S.A., CLARKE, R.C. et al. Amplification of InvA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Molecular and Cellular Probes*. London, v.6, p.271-279,1992.

ROBINSON.S. – The big five: Most Common Salmonella Strains in Foodborne Illness outbreaks. Disponível em: <https://www.foodsafetynews.com/2013/08/the-five-most-common-salmonella-strains/>. Acessado em 04 de abr. 2019.

SAEED, A.M., NAIR, U.S. Use of molecular biological markers in the epidemiology study of Salmonella enterica serovar Enteritidis infections in humans and animals. In: SAEED, A. M.

Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals –epidemiology, pathogenesis and control. 1.ed. Ames: Iowa State University Press, 161-170, 1999.

SILVA, W.P. et al. Qualidade microbiológica de linguiças mistas do tipo frescal produzidas na cidade de Pelotas (RS). B. CEPPA, v.20, n.2, p.257-266, 2002.

SPRICIGO, D.A., MATSUMOTO, S.R., ESPÍNDOLA, M.L., VAZ, E.K., FERRAZ, S.M. Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguiças suínas tipo frescal em Lages, SC. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.60, n.2, p.517-520, 2008.

STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; McVEY, S.; GALLAND, J.; CURTSS, R.; KELLY, S. M.; CHEMGAPPA, M. Detection of *S.typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 5, p. 1292-1295, 1994.

TESSMANN, C. et al. Prevalência de *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em linguiça do tipo frescal derivadas de carne suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. Foz do Iguaçu: SBM, 2001.

REFERÊNCIAS

Bacteriological Analytical Manual da Food and Drug Administration.(2018) Disponível em <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam-on-line>. Acessado em 02 de fev. 2019.

BIDOL, S. A., et al. Multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants-United States, 2005-2006. **MMWR** Morb. Mortal. Wkly. Rep. 56:909-911. 2007.

BOYD, E.F., WANG, F., WHITTAM, T.S. AND SELANDER, R.K. **Molecular genetic relationships of the salmonellae.** *Applied and Environmental Microbiology* .62, 804– 808.1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça. Instrução Normativa nº 4, de 31 de Março de 2000. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil] Brasília, DOU 04/04/2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RISPOA. DECRETO Nº 9014 DE 29 de março de 2017. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, 30 de março de 2017, retificado 1º de junho de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf> . Acessado em: 15 de mai. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp: diagnóstico do gênero *Salmonella* / Ministério da

Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.60 p.: il. – (série A. Normas e manuais técnicos).

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Outbreak of *Salmonella* Infections Linked to Pre-Cut Melons. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/carrau-04-19/index.html>. Acessado em 27 de jun. 2019.

CORREIA, L. M. M. **Multiplicação de microbiota autóctone e de Staphylococcus aureus inoculado em linguças frescas produzidas com diferentes concentrações de sais de cura: um estudo em Curitiba**. 2008. 85 f. Dissertação (Pós Graduação em Tecnologias de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

DARWIN, K.H. AND V.L. MILLER, 1999. Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. Clin. Microbiol. Rev., 12: 405-428.

DOYLE, M.P. Foodborne bacterial pathogens. In: HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Maryland: Williams & Wilkins 1994.

EWING, W.H. Edwards and ewing's identification of enterobacteriaceae. 4th ed. New York: **Elsevier Science Publishing**; p. 81-318. 1986.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da Segurança dos Alimentos. 2ª edição ed.[s.l.] Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. DE M. LANDGRAF, M/ colaboradora Maria Teresa Destro. Microbiologia dos Alimentos, São Paulo: Editora Atheneu, 2008 , pg18

FRANCO, B.D.G.M & LANDGRAF, M. Microbiologia de Alimentos, 1 ed. São Paulo, 1996.

GANDRA, E. A., GANDRA, T. K. V., MELLO, W. S., GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Science, Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GAST RK. Paratyphoid infections. In: CALNEK, BW, BARNES HJ, BEARD CW, Mc DOUGALD LR, SAIF YM, editores. **Diseases of Poultry**. 10th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. p.97-129. 1997.

GAST, R.K. Salmonella infections. In: SAIF, Y.M. et al. **Diseases of poultry**. 11.ed. Ames: Iowa State University, Cap.16, p.567-599. 2003.

GONÇALVES,J.R. **Classificação dos embutidos cárneos**. In LEMOS, A.L.S.C; YAMADA, E;A. **Princípios do processamento de embutidos cárneos**. Campina: CTC do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, 2003.

GOUVEIA, F. Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos. Inovação Uniemp 2006. Disponível em: < <http://inovacao.scielo.br/pdf/innov/v2n5/a20v02n5.pdf>>. Acessado em 28 de fev. 2019.

GUIMARÃES, A.R. **Resistência aos antimicrobianos, diversidade e relação epidemiológica de bactérias do gênero *Salmonella* spp. isoladas na granja de terminação e abate de suínos.** 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2006 – Pesquisa Industrial Anual 2006, PIA-Produto. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/industria/pia/produtos/produto2006/piaproduto2006.pdf>. Acessado em: 02 de Jan. de 2019

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579:** Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4th ed. Geneva, 2002. Amendment 1: 15 jul. 2007.

JAMSHIDI, A., BASSAMI, M., AFSHARI-NIC, S. 2009. Identification of *salmonella* species and *Salmonella* Typhimurium by a multiplex PCR based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran. *Int.J. Vet. Res.* 3:43– 48.

JUNEJA, V. K.; MELENDRES, M. V.; HUANG, L.; SUBBIAH, J.; THIPPAREDDI, H.; Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditional from 10 to 45°C. *Int J Microbiol*, Cairo, v .31, p.106-111, 2009.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, J. R. WC. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.** 5. ed. Philadelphia: Lippincott, 1395 p. 1997.

KUMAR, R., SURENDRAN, P. K., THAMPURAN, N. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. **Letters in Applied Microbiology**, Oxfordn. 46, v. 2, p. 221-226, 2008.

LEITE. L.H.M. & WAISSMANN W. Doenças Transmitidas por Alimentos na população idosa: Riscos e Prevenção. **Rev. Ciênc. Méd.**, Campinas, 15(6): 525-530, nov./dez., 2006.

LEMOS, A. L. S.; YAMADA, E.A. Princípios do processamento de embutidos cárneos. Campinas: CTC do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, 2003.

LEMOS, A.L.S. Ingredientes e aditivos no processamento de embutidos; In LEMOS, A.L.S.C; YAMADA, E.A. Princípios do processamento de embutidos cárneos. Campinas: CTC do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, 2003.

MALORNY, B., HUEHN, S., DIECKMANN, R. KRÄMER, N., HELMUTH, R. Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection and Serovar Identification of *Salmonella* in Food and Feeding Stuff. **Food Analytical Methods**, New York, v. 2, p. 81-95, 2009.

MERCK. Manual de medios de cultivo. Darmstadt, 1990.

Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>. Acessado em: 05 de Jan. 2019.

MIRANDA, P.C.; BARRETO, N.S.E. Avaliação higiênico-sanitária de diferentes estabelecimentos de comercialização da carne-de-sol no município de Cruz das Almas-BA. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p. 166-172, 2012.

MOREIRA, Natália Menezes. **MÉTODOS DE TIPIFICAÇÃO DE *Salmonella spp.*** - Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

NEWTON, A; LOPES, D.A.G. Produção de Embutidos. Viçosa MG, CPT-2008.

OLIVEIRA, M.J. Quantificação de nitrato e nitrito em linguças do tipo frescal. **Ciência tecnologia de alimentos**, Campina, v 25, nº4 ;dez 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612005000400018&script=sci_arttext. Acessado em 01 de Janeiro de 2018.

OLIVO, R; OLIVO, N. O mundo das carnes: ciência, tecnologia & mercado. 4 ed. Criciúma: Ed. Do autor, 214p, 2006.

PARDI, M.C. Ciência, higiene e tecnologia da carne. Goiânia: CRGRAF-UFG/Niterói: EDUFF, 110p, 1993.

PARDI, M.C. Ciência, higiene, e tecnologia da carne. Goiânia: Ed UFG, 1996, 226p.

POPOFF, M.Y; BOCKEMÜH, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (nº.46) to the Kauffmann-White scheme. **Res. Microbiol.**, V155, n.7, p 568 – 570, 2004.

RUSSEL, S.M. Controlling Salmonella in Poultry Production and Processing. Boca Raton: CRC Press, 2012.

SILVA, I.M.M., EVÊNCIO-NETO, J., SILVA, R.M., LUCENA-SILVA, N., MAGALHÃES, J., BALIZA, M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte. 63, n.2, p.333-339, 2011.

SILVA, J.A. Tópicos da Tecnologia dos Alimentos. São Paulo: Varela, 227p. 2000.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN. Doenças Transmitidas por Alimento-Notificações Registradas: banco de dados. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> Acesso em: 01 jun. 2019.

SPRICIGO, D.A. MATSUMOTO, S R. ESPÍNDOLA M. L, FERRAZ S.M. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça frescal suína. **Ciência e tecnologia de Alimentos**. Campinas, 28(4): 779-785 out.-dez. 2008

STERZO, E.V. et al. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella enterica* serovar Enteridis experimental infection in chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science** v.9, n.1, p.69-73, 2007.

TERRA, A.B.M; FRIES, L.L.M; TERRA, N.N. Particularidade na Fabricação de Salame. São Paulo: Varela, 2004. 152p.

VAN DUIJKEREN, E. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.8, p.3574–3578, 2003. .

VIEIRA, P. Pesquisa de desenvolvimento dríblam dos defeitos mais com em embutidos. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, nº 273, p. 80-84, 1999.

WELKER, C.A.D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências.**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, jan./mar. 2010.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness.**, 2007. Disponível em : https://foodhygiene2010.files.wordpress.com/2010/06/who-food_safety_fact-sheet.pdf. Acessado em 01 jan. 2019.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne disease.** Disponível em: http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/>. Acessado em: 28 Jan. 2018.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics 2015.** Disponível em: https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2015/en/. Acessado em: 01 Jan. de 2019

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/en/. Acessado em 01 de jan.2019.