UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo

Christiane Asturiano Ristori Costa

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Bernadette D. G. de Melo Franco

São Paulo

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Christiane Asturiano Ristori Costa

Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo

Comissão da Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

_____
Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Orientadora/Presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, de de 2010.

Dedicatória

Aos maiores tesouros da minha vida:

Minha filha **Giovanna** e meu marido **Orlando**, pela paciência, apoio e muito amor que me confortam em todos os momentos da vida.

Á minha querida irmã, meu anjinho, **Carla** (in memoriam), pelos ensinamentos de vida e amor, que jamais serão esquecidos.

Aos meus filhos de coração **Gabriel**, **Dharan** e **Dhyana** pela paciência e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco pela oportunidade, estímulo, amizade e ensinamentos compartilhados. Obrigada mestre, principalmente, pela confiança!!

À Diretoria do Instituto Adolfo Lutz, em especial à Dra. Deise A. P. Marsiglia, Diretora do Serviço de Alimentos, pelo apoio e incentivo.

À Dra. Miyoko Jakabi pela demonstração de carinho, paciência, apoio e incentivo nos momentos em que parecia que tudo ia dar errado e, principalmente, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo dos anos. Mi mais do que tudo: Obrigada pela sua amizade!

À Dra. Maria Luisa Barbosa obrigada por tudo e, sobretudo pela sua amizade, apoio e palavras de conforto nas horas difíceis. Malu: “O verdadeiro Mestre é aquele que prefere dividir o que possui, a ter somente para si; é aquele que se sente feliz quando percebe que o caminho que abriu tem sido trilhado por muitos”.

À Dra. Dilma S. Gelli, minha primeira mestre, sinônimo de dedicação ao trabalho e contribuição à pesquisa científica, obrigada pelos ensinamentos transmitidos ao longo dos anos que contribuíram para minha formação e amadurecimento na carreira científica.

À Ruth E. G. Rowlands, o que falar de alguém que foi e continuará a ser parceira no trabalho? Só me resta agradecer muito pelo apoio, conselhos, paciência e mais do que qualquer coisa pela amizade. Essa etapa é apenas o começo de grandes realizações que terão continuidade ao longo do seu doutorado.

À Cecília G. Martins (Ceci) pela amizade, pelas dicas e conselhos, por todo apoio e ajuda durante o trabalho (sei que está sentindo falta de plaquear mais de 600 placas de meio de cultura semanalmente)!

À Maria Imaculada Góes e Zenaide de Souza pelo recebimento das amostras e emissão dos laudos e, principalmente, pelo incentivo, ajuda, apoio e pela amizade.

Aos colegas da Seção de Microbiologia Alimentar do IAL: Ailton, Ana Maria, Emerson, Harumi, Jucinei, Giselle, Raquel, Roberto, pelo apoio e paciência.

Aos estagiários da Seção de Microbiologia Alimentar do IAL: Ana Paula, Camila, Eduardo, Luciana, Simone e Tatiani pelo apoio e principalmente pelos momentos de descontração e risadas que tornavam os dias de trabalho bem mais amenos. Ana, Ca, Lu e Si obrigada também pela grande ajuda e pelas mais de 600 placas de meio feitas semanalmente!

Aos funcionários da Seção de Meios de Cultura do IAL, em especial à Júlia T. U. Yoshida e ao Carlos Fragetti Jr., pela atenção, paciência e colaboração ao longo de todo trabalho.

À Dra. Tânia M. I. Vaz e à Dra. Sueli Fernandes do Setor de Enterobactérias, Seção de Bacteriologia do IAL, pela disponibilibilidade em contribuir com o trabalho e, principalmente, à Dra. Ângela C. R. Ghilardi pela sorotipificação das cepas de *Salmonella*.

Aos funcionários da Seção de Coleção de Culturas do IAL pelo fornecimento das cepas utilizadas para controle.

À todos os funcionários da COVISA: Sra. Maria de Lourdes E. Blassioli, Evanise S. Araújo, Leonardo M. Fávero e Ademir pela coleta das amostras, paciência e cooperação ao longo do trabalho.

À Dra. Dory Worcman-Barnika, Dra. Mariza Landgraf e Dr. Laércio Goularte pelas valiosas sugestões e correções durante o exame de qualificação.

À Mônica, Cleonice e Edílson da Secretaria do Departamento, por toda atenção, dedicação e serviços prestados.

À Elaine e Jorge da Secretaria de Pós-Graduação, pela atenção e serviços prestados.

Às bibliotecárias Leila Aparecida Bonadio, Marina, Adriana de Almeida Barreiros da Biblioteca do Conjunto das Químicas, por toda atenção e serviços prestados.

À Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À minha MÃE, Myriam Asturiano, e meu PAI, Sérgio Ristori Sobrinho, cada um do seu modo, com a sua verdade e com a sua forma de expressão de amor. Obrigada pelas lições de vida, dedicação e por toda minha formação dada ao longo desses anos.

À todos da minha família e todos os amigos pelo apoio, amor e carinho!

E à todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta tese e que não foram aqui explicitamente citados, mas a quem expresso o meu mais profundo agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS v
RESUMO vii
ABSTRACT ix
1. INTRODUÇÃO 1
1.1 *Listeria monocytogenes* 6
1.2 *Salmonella* spp. 12
1.3 *Campylobacter* spp. 17
1.4 *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) 22
2. OBJETIVOS 28
3. MATERIAL E MÉTODOS 29
3.1 MATERIAL 29
3.1.1. Amostragem 29
3.2 MÉTODOS 30
3.2.1 Preparo das amostras 30
3.2.2 Meios de cultura 30
3.2.3 Detecção de *Listeria monocytogenes* 31
3.2.4 Enumeração de *Listeria monocytogenes* 33
3.2.5 Sorotipagem molecular de *Listeria monocytogenes* 35
3.2.6 Detecção de *Salmonella* spp. 38
3.2.7 Enumeração de *Salmonella* spp. 40
3.2.8 Detecção de *Campylobacter* spp. 42
3.2.9 Detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) 44
3.2.10 Enumeração de coliformes termotolerantes 48
3.2.11 Análise Estatística 48
4. RESULTADOS 49
4.1 *Listeria monocytogenes* 52
4.1.1. Sorotipagem molecular de *L. monocytogenes* 54
4.2 *Salmonella* spp. 59
4.3 *Campylobacter* spp. 62
4.4 *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) 63
4.5 Enumeração de Coliformes Termotolerantes 64

4.5.1 Avaliação da correlação entre a população de coliformes termotolerantes e a presença dos patógenos nas amostras de produtos cárneos estudadas. 65
5. DISCUSSÃO.....66
5.1 *Listeria monocytogenes*.....67
5.2 *Salmonella* spp.....74
5.3 *Campylobacter* spp. 80
5.4 *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) 83
5.5 Coliformes Termotolerantes 85
7. CONCLUSÕES.....86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....88

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Esquema da metodologia empregada para detecção de *Listeria monocytogenes*..... 32

Figura 02 - Esquema da metodologia empregada para enumeração de *Listeria monocytogenes*..... 34

Figura 03 - Esquema da metodologia empregada para detecção de *Salmonella* spp..... 39

Figura 04 - Esquema da metodologia empregada para enumeração de *Salmonella* spp..... 41

Figura 05 - Esquema da metodologia empregada para detecção de *Campylobacter* spp..... 43

Figura 06 - Esquema da metodologia empregada para detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC)..... 47

Figura 07 - Positividade de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* (STEC) nos diferentes tipos de produtos cárneos analisados..... 50

Figura 08 - Distribuição da positividade de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* (STEC) nos produtos cárneos analisados, de acordo com a região de coleta no município de São Paulo..... 51

Figura 09 - Eletroforese de gel de agarose com perfis de fragmentos de DNA gerados pela PCR multiplex para sorotipagem molecular de cepas *L. monocytogenes*..... 54

Figura 10 - Distribuição dos perfis de sorotipagem molecular das cepas de *L. monocytogenes* sorotipadas, de acordo com o tipo de produto cárneo analisado..... 57

Figura 11 - Perfil molecular de sorotipagem de *L. monocytogenes* das amostras de controle..... 57

Figura 12 - Perfil molecular de sorotipagem de *L. monocytogenes* de algumas cepas isoladas dos produtos cárneos analisados..... 58

Figura 13 - Detecção dos genes stx_1, stx_2, *eaeA* e *hly* nas cepas de controle e dos isolados dos produtos cárneos..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - *Primers* utilizados na sorotipagem de *Listeria monocytogenes* segundo Doumith et al. (2004)..... 35

Tabela 02 - Cepas padrão utilizadas como controle positivo e negativo, segundo sorotipo e genes..... 36

Tabela 03 - *Primers* utilizados para a detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* e *hly* por PCR multiplex segundo Paton e Paton (1998b)..... 45

Tabela 04 - Ocorrência de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.; *Campylobacter* spp. e *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) nos produtos cárneos analisados..... 49

Tabela 05 - Distribuição das espécies de *Listeria* nos produtos cárneos estudados..... 52

Tabela 06 - Positividade para *L. monocytogenes* nos produtos cárneos estudados, de acordo com o método de análise utilizado (detecção ou enumeração)..... 53

Tabela 07 - Distribuição das amostras de produtos cárneos estudados de acordo com a contagem de *L. monocytogenes*..... 53

Tabela 08 - Distribuição dos perfis de sorotipagem molecular das cepas de *L. monocytogenes* isoladas..... 55

Tabela 09 - Distribuição dos perfis de sorotipagem molecular das cepas de *L. monocytogenes* sorotipadas, de acordo com o tipo de produto cárneo analisado..... 56

Tabela 10 - Positividade de *Salmonella* spp. nas amostras de lingüiça estudadas, de acordo com o método de análise utilizado (detecção ou enumeração)..... 60

Tabela 11 - Positividade de *Salmonella* spp. nas amostras de coxa de frango estudadas, de acordo com o método de análise utilizado (detecção ou enumeração)..... 61

Tabela 12 - Distribuição das amostras de produtos cárneos analisados de acordo com o NMP de coliformes termotolerantes por grama..... 64

Tabela 13 - Relação entre a população de coliformes termotolerantes e a positividade para *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. nas amostras analisadas..... 65

RESUMO

RISTORI, C. A. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo.** 2010. 112 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As Enfermidades Transmitidas por Alimentos representam um crescente e relevante problema de saúde pública. Além do prejuízo social, a contaminação de alimentos com microrganismos patogênicos gera um enorme prejuízo econômico. Técnicas de Análise de Risco permitem mensurar de forma mais adequada o impacto dos microrganismos contaminantes de alimentos na saúde da população. Uma Análise de Riscos, associada a uma combinação patógeno-alimento, envolve três passos: avaliação do risco, gestão do risco e comunicação do risco. Uma das etapas da avaliação do risco é a avaliação da exposição, baseada em dados sobre freqüência e nível de contaminação dos alimentos pelo patógeno avaliado no alimento em questão, o nível atingido pelo patógeno no momento do consumo e os padrões de consumo. Os produtos cárneos são os principais alimentos responsáveis pela veiculação de patógenos ao homem e os microrganismos de maior relevância nestes produtos são *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga. O objetivo do presente estudo foi gerar informações qualitativas e quantitativas desses quatro patógenos em produtos cárneos (salsicha bovina, lingüiça suína, carne bovina moída e coxa de frango) comercializados no município de São Paulo, de forma a contribuir com dados para futuras avaliações de risco em relação a estes microrganismos nestes produtos. Das 552 amostras de produtos cárneos analisadas, *L. monocytogenes* foi o patógeno isolado com maior freqüência, sendo detectado em 48,7% das amostras, seguido por *Campylobacter* spp. em 6,0% e *Salmonella* spp. em 5,8%. *E. coli* produtora de toxina de Shiga não foi detectada em nenhuma das amostras estudadas. *Listeria monocytogenes* foi detectada em todos os tipos de produtos cárneos estudados,

com freqüências mais elevadas nas amostras de carne bovina moída (59,4%), seguido de coxa de frango (58,0%), lingüiça suína (39,8%) e salsicha bovina (37,7%). Na maioria das amostras (94,4%), as contagens de *L. monocytogenes* foram inferiores a 10^2 UFC/g. As cepas de *L. monocytogenes* apresentaram ampla distribuição, sendo detectados os quatro grupos de sorotipos: 28,7% pertenceram ao Grupo 1 (sorotipos 1/2a e 3a), 21,0% ao Grupo 2 (sorotipos 1/2c e 3c), 17,0% ao Grupo 3 (sorotipos 1/2b, 3b e 7) e 13,8% ao Grupo 4 (sorotipos 4b, 4d e 4e). *Salmonella* spp. foi detectada em 32 amostras, sendo 20 (14,5%) de lingüiça e 12 (8,7%) de coxa de frango. As contagens foram baixas, variando de 3,0 a 9,3x10 NMP/g e os sorovares mais freqüentemente isolados foram *S.* Typhimurium (28,1%), *S.* Enteritidis (12,5%), *S.* Derby (12,5%) e *S.* I 4,[5],12:i:- (12,5%). *Campylobacter* spp. foi detectado em 33 amostras (6,0%), sendo 27 de coxa de frango (19,6%) e seis amostras de carne moída (4,3%). A presença de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. nos produtos cárneos analisados representa um risco à saúde da população. O consumo destes produtos quando submetidos à cocção inadequada e/ou a contaminação cruzada com outros alimentos pode levar a ocorrência de Enfermidades Transmitidas por Alimentos.

Palavras chave: Produtos cárneos. *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* spp. *Campylobacter* spp. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga.

ABSTRACT

RISTORI, C. A. **Assessment of consumer exposure to *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in refrigerated meat products at retail in São Paulo municipality.** 2010. 112 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Foodborne Diseases represent an increasingly important public health problem. Besides the social losses, contamination of food with pathogenic microorganisms generates an enormous economic damage. A more accurate measurement of the impact of microorganisms in food health can be achieved using Risk Analysis techniques. A risk analysis is composed by three elements: risk assessment, risk management and risk communication. One of the four steps of a risk assessment is the exposure assessment, based on data on frequency and level of contamination of a food by the pathogen under evaluation, levels of the pathogen in the food at the time of consumption and consumption patterns. Meat products are the main vehicles of pathogens to humans, where *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are the most relevant pathogens**.** The aim of this study was to obtain qualitative and quantitative information on these four pathogens in four types of meat products (beef sausage, pork sausage, ground beef and chicken leg) marketed in the city of Sao Paulo in order to contribute with data for future risk assessments for these microorganisms in these products. *L. monocytogenes* is the most frequent pathogen in the 552 samples of meat products analyzed, being detected in 48.7% of the samples, followed by *Campylobacter* spp. 6.0% and *Salmonella* spp. 5.8%. Shiga toxin-producing *E. coli* was not detected in any sample. *L. monocytogenes* was detected in all types of meat products, with highest frequency in ground beef (59.4%), followed by chicken leg (58.0%), pork sausage (39.8%) and beef sausage (37.7%). In most samples (94.4%), the counts of *L. monocytogenes* were below 10^2 CFU/g. *L. monocytogenes* strains were widely distributed in the four groups of serotypes: 28.7% belonged to Group 1 (serotypes 1/2a and 3a), 21% to Group 2 (serotypes 1/2c and 3c), 17% to Group 3

(serotypes 1/2b, 3b and 7) and 13.8% to Group 4 (serotypes 4b, 4d and 4e). *Salmonella* spp. was detected in 32 samples, being 20 (14.5%) of pork sausage and 12 (8.7%) of chicken leg. The counts were low, ranging from 3.0 to 9.3 x 10 MPN/g and the most frequent serovars were *S.* Typhimurium (28.1%), *S.* Enteritidis (12.5%), *S.* Derby (12.5%) and *S.* I 4, [5], 12: i: - (12.5%). *Campylobacter* spp. was detected in 33 samples (6.0%), being 27 of chicken leg (19.6%) and six samples of ground beef (4.3%). The presence of *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in the tested meat products represent a risk to health. The consumption of inadequately cooked products and/or subjected to cross-contamination with other foods may lead to occurrence of foodborne diseases.

Keywords: Meat Products. *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* spp. *Campylobacter* spp. Shiga toxin-producing *Escherichia coli.*

1. INTRODUÇÃO

As Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA) representam um crescente e relevante problema de saúde pública, sendo responsáveis por doenças de gravidade variável e óbitos em todo o mundo. As infecções de origem bacteriana, transmitidas por alimentos, são importantes causa de gastrenterites severas, que podem resultar em hospitalizações, complicações e seqüelas a longo prazo (GREIG; LEE, 2009; HELMS; SIMONSEN; MOLBAK, 2006; SCHLUNDT, 2002). As ETA são as principais causas de doença e morte em países em desenvolvimento, ocasionando em média 2,1 milhões de óbitos anualmente, sendo a maioria crianças (SCHLUNDT, 2002). Estima-se que dos 1,5 bilhões de episódios de diarréia que ocorrem em crianças menores de cinco anos, (WHO, 1996), mais da metade é causada por alimentos (ESREY; FEACHEM, 1989).

A diarréia é um dos principais sintomas das ETA, mas outras complicações severas podem ocorrer como falência hepática e renal, distúrbios neurológicos e cerebrais, podendo levar a morte (SCHLUNDT, 2002).

Mesmo nos países em que o sistema de notificação e investigação de surtos está implementado e consolidado, a real dimensão do problema ainda é desconhecida. Nos países desenvolvidos calcula-se que, por ano, mais de 30% da população seja afetada por ETA. Nos Estados Unidos, estima-se que 76 milhões de pessoas são afetadas pelas doenças de origem alimentar, com 323.000 hospitalizações e 5.000 óbitos (WHO, 2007). Nos países em desenvolvimento esse número pode ser ainda maior. A ausência de dados confiáveis sobre as ETA dificulta a compreensão da sua importância para a saúde pública e impede o desenvolvimento de soluções baseadas em gestão do risco (SCHLUNDT, 2002).

Na maioria dos países, somente algumas doenças, que são ou podem ser de origem alimentar, aparecem na lista de doenças de notificação obrigatória. Além disso, os relatos dos sintomas clínicos não são apresentados de maneira uniforme. Enquanto um país pode relatar a incidência de shigelose e amebíase

separadamente, outro pode comunicá-las conjuntamente sob o termo de disenteria. Da mesma forma, o significado do termo intoxicação alimentar varia de país para país e, não raramente, é utilizado para representar diferentes grupos de doenças (SCHLUNDT, 2002).

No Brasil, em 1999, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde implantou a vigilância epidemiológica das Enfermidades Transmitidas por Alimentos (VE-DTA) para determinar a incidência dos surtos. Entretanto, a implantação desse sistema no país, ainda é heterogênea, pois nem todas as secretarias, estaduais e municipais, de saúde implantaram o sistema (CARMO et al., 2005).

Segundo dados da SVS, no período de 1999 a julho de 2008, ocorreram no Brasil, 6.062 surtos de ETA, com 117.330 afetados e 64 óbitos. Desses surtos apenas 2.974 tiveram o agente etiológico elucidado, sendo 84% causado por bactérias, das quais *Salmonella* spp. foi o agente responsável por 42,9% dos surtos e *Salmonella* Enteritidis por 4%. Dentre os agentes considerados menos freqüentes, *Campylobacter* spp. foi relatado em quatro (0,13%) surtos. Os produtos cárneos estão entre os alimentos mais comumente envolvidos nesses surtos e os domicílios foram apontados como local de maior ocorrência. Entre os estados brasileiros, São Paulo foi o que mais notificou, contabilizando 1.395 surtos de ETA no período de 1999 a 2008 (BRASIL, 2008).

A contaminação de alimentos gera um enorme impacto social e econômico nas comunidades e seus sistemas de saúde. Nos Estados Unidos, as doenças causadas pelos principais patógenos geram um gasto anual, estimado, de 35 bilhões de dólares, considerando custos médicos e perda de produtividade. Outro exemplo clássico, quanto aos impactos econômicos, foi a re-emergência da cólera no Peru, em 1991, que resultou em um prejuízo de 500 milhões de dólares na exportação de peixes e derivados (WHO, 2007).

Dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde reportam que, no Brasil, no período de 1999 a 2004, cerca de 3,4 milhões de pessoas foram internadas por ETA, gerando custos de 280 milhões de reais, com uma média anual de 46 milhões (CARMO et al., 2005).

Segundo Van Amson, Haracemiv e Masson (2006), no ano de 2000, no Estado do Paraná, ocorreram 219 surtos de ETA, com aproximadamente 8.663 afetados e 1.000 pessoas hospitalizadas. Os gastos do governo, somente com as internações hospitalares foram em torno de 18 milhões de reais. Além disso, segundo o Hospital de Clínicas de Curitiba, pacientes que são internados devido a essas enfermidades ficam hospitalizados, em média, por quatro dias.

Praticamente todos os alimentos podem ser veículos de inúmeros patógenos, resultando em surtos de ETA. A contaminação de produtos alimentícios pode ocorrer em qualquer ponto da cadeia alimentar, desde a produção primária (no campo) até o ponto de consumo (consumidor). As principais causas de doenças de origem alimentar podem ser resultantes de contaminação cruzada entre os alimentos e contaminação durante o processamento ou preparação, incluindo a contaminação por manipuladores (GREIG; RAVEL, 2009).

Os principais alimentos responsáveis pela veiculação de patógenos ao homem são as carnes e seus derivados (BORCH; ARINDER, 2002; HUGHES; GILLESPIE; O'BRIEN, 2007; RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009). Esses alimentos representam excelentes meios para a multiplicação bacteriana, devido a variedade de nutrientes, alta atividade de água e baixa acidez, pH entre 5,5 e 7,0 (ICMSF, 2005).

Os animais de corte podem ser portadores de bactérias patogênicas em seu trato intestinal. Durante o abate, as carcaças podem ser contaminadas e subseqüentemente os microrganismos podem ser encontrados nos cortes das carnes ou nos produtos processados derivados dessa carcaça. A contaminação pode ocorrer em qualquer etapa do processo de abate, armazenamento e distribuição. A freqüência e o nível de contaminação de carcaças de animais recém-abatidos podem variar, dependendo das condições climáticas e higiênicas do local de criação, abate, transporte e das boas práticas de fabricação (BORCH; ARINDER, 2002).

O desenvolvimento e o avanço tecnológico na produção e industrialização de carnes e produtos cárneos resultaram em melhorias consideráveis nas condições higiênicas encontradas. Porém, apesar de inúmeros avanços, as

doenças de origem alimentar continuam ocorrendo (CALLAWAY et al., 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 75% das doenças que têm afetado o homem nos últimos dez anos são causadas por patógenos presentes em animais ou em produtos de origem animal. Muitas dessas doenças tornam-se um problema global devido ao seu potencial de disseminação.

Os acordos estabelecidos no comércio internacional de alimentos induzem o estabelecimento de rígidas normas e padrões para a produção e o comércio de alimentos inócuos e de qualidade (FAO, 1998). Alimentos inócuos contribuem para a saúde e produtividade e representam uma plataforma eficaz para o desenvolvimento humano e redução da pobreza (SCHLUNDT, 2002).

Uma nova ferramenta para se avaliar o impacto dos microrganismos contaminantes de alimentos na saúde da população é a Análise de Risco, que tem um papel importante no processo de tomada de decisões em questões de inocuidade dos alimentos. Através de sua aplicação, os diferentes pontos de controle na cadeia alimentar são identificados e as opções de intervenções, e os respectivos custos e benefícios de cada medida são avaliados, permitindo o gerenciamento eficiente dos riscos (FAO; WHO, 2006). Uma das etapas desse processo é a Avaliação de Risco, que é um processo científico de geração de dados, composto por quatro etapas: identificação do perigo, avaliação da exposição, avaliação da relação da dose–resposta e caracterização do risco. A Avaliação de Risco fornece uma estimativa qualitativa ou quantitativa da probabilidade e severidade dos efeitos adversos para uma determinada população. O objetivo principal da Avaliação de Risco é fornecer aos gestores de risco as informações científicas necessárias para a compreensão da natureza e extensão do risco em inocuidade alimentar, e para o planejamento de ações de mitigação, controle ou de prevenção, quando necessário (ICMSF, 2002; OPAS, 2008).

A Avaliação de Risco pode utilizar dados quantitativos, qualitativos e/ou semi-quantitativos, que devem ser de alta qualidade em relação à precisão e confiabilidade. As conclusões devem ser geradas a partir de evidências científicas bem fundamentadas (ICMSF, 2002; OPAS, 2008).

Na maioria dos países, inclusive no Brasil, Avaliações de Risco são difíceis de serem realizadas devido às inúmeras lacunas, com destaque para a fragilidade dos dados epidemiológicos sobre a prevalência e características das ETA. Além dessa deficiência, os dados quantitativos de microrganismos patogênicos de relevância na cadeia produtiva de alimentos ainda são escassos.

Com relação aos produtos cárneos, há consenso internacional que os patógenos de maior relevância são *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (ICMSF, 2005; SCHLUNDT, 2002). Esse trabalho foi realizado com o objetivo de gerar informações qualitativas e quantitativas desses quatro patógenos em produtos cárneos (salsicha bovina, lingüiça suína, carne bovina moída e coxa de frango) comercializados no município de São Paulo, de forma a contribuir com dados confiáveis para futuras avaliações de risco em relação a estes microrganismos nestes produtos.

1.1 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é dividido em seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* e *Listeria grayi*. A principal espécie patogênica ao homem e animais é *L. monocytogenes*, contudo *L. ivanovii* e *L. seeligeri* já foram relacionadas a alguns casos de infecção humana (JEMMI; STEPHAN, 2006; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Treze sorotipos de *L. monocytogenes* capazes de causar infecção no homem já foram identificados, entretanto somente três (1/2a, 1/2b e 4b) são associados com a maioria dos casos. O sorotipo 4b está envolvido em quase todos os surtos (ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; VASILEV et al., 2009), sugerindo que as cepas desse sorotipo são mais adaptadas aos tecidos de mamíferos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). No Brasil, os sorotipos predominantes são 4b e 1/2a (HOFER; REIS; HOFER, 2006; HOFER; RIBEIRO; FEITOSA, 2000; LEMES-MARQUES; CRUZ; DESTRO, 2007).

L. monocytogenes pode causar a listeriose, uma das mais severas infecções de origem alimentar, que tem baixa morbidade e alta mortalidade (até 50%) (ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000). Ao contrário da maioria dos patógenos, que geralmente provocam apenas sintomas gastrintestinais, a listeriose em humanos se caracteriza por infecções do sistema nervoso central (meningite, encefalite e meningoencefalite), bacteremia primária e septicemia. Há outras formas clínicas atípicas em cinco a 10% dos casos, tais como: endocardite, miocardite, pneumonia, hepatite, pleurite, peritonite e abscessos localizados (por exemplo: abscessos cerebrais), artrite, osteomielite e otite (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A enfermidade acomete, principalmente, grupos de risco, como gestantes, neonatos, idosos e indivíduos com imunossupressão adquirida ou induzida, como aqueles portadores do vírus humano da imunodeficiência (HIV), transplantados, com diabetes e que fazem uso de quimioterápicos (RAMASWAMY et al., 2007; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Em comparação com indivíduos saudáveis, as gestantes têm 14 vezes mais risco de contrair listeriose após o consumo de alimento contaminado com *L. monocytogenes* (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Embora a listeriose possa acontecer em qualquer fase da gestação, sua ocorrência é maior no último trimestre da gravidez (POSFAY-BARBE; WALD, 2009). O patógeno pode atravessar a placenta e ocasionar nascimento prematuro, natimortalidade, aborto ou listeriose neonatal (VASILEV et al., 2009). *L. monocytogenes* é reconhecida como uma das três maiores causas de meningite em neonatos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; POSFAY-BARBE; WALD, 2009).

Recentemente têm ocorrido casos de listeriose em que os principais sintomas são apenas gastrintestinais e febris. Essas epidemias têm curto período de incubação, acometem indivíduos aparentemente saudáveis e são causadas por *L. monocytogenes* dos sorotipos 1/2 e 4b, encontradas em concentrações elevadas nos alimentos envolvidos nestes casos (RAMASWAMY et al., 2007).

A dose infecciosa de *L. monocytogenes* não está estabelecida, mas estima-se que varia de 10^2 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama do alimento ingerido, porém pode ser mais baixa em indivíduos imunocomprometidos (JEMMI; STEPHAN, 2006) e pacientes com acidez gástrica diminuída ou que passaram por cirurgia de úlcera (DONNELLY, 2001). O período de incubação também não está definido, mas estima-se que pode ser de até três semanas (POSFAY-BARBE; WALD, 2009).

A conduta, com relação aos limites toleráveis de *L. monocytogenes* em alimentos difere entre os países. Nos Estados Unidos, Canadá e Dinamarca estabeleceu-se a chamada "Tolerância Zero", onde não é permitida a presença do patógeno em 25 gramas do alimento. Entretanto na maioria dos países europeus, o limite permitido é de até 100 UFC/g no alimento no momento do consumo (LIANOU; SOFOS, 2007).

A legislação brasileira, Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 do Ministério da Saúde, determina a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g somente em alguns tipos de queijo. Para outros alimentos, como produtos cárneos, não existe limite regulatório (ANVISA, 2001a).

L. monocytogenes utiliza uma variedade de mecanismos para escapar da resposta imune do hospedeiro. A sobrevivência intracelular é essencial para que o patógeno não somente sobreviva nas células epiteliais, mas também dentro de células como macrófagos, responsáveis em eliminá-lo (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). *L. monocytogenes* pode infectar as células por dois mecanismos diferentes: invasão direta ou propagação célula a célula (*cell-to-cell spread*) (POSFAY-BARBE; WALD, 2009).

Após entrar no organismo hospedeiro por via oral, *L. monocytogenes* atinge o trato intestinal, aderindo e invadindo a mucosa. A partir do momento que alcança a corrente sanguínea, a célula bacteriana é fagocitada por macrófagos e após a lise do fagossoma, é liberada no citoplasma da célula hospedeira onde se multiplica rapidamente. O patógeno usa a polimerização de filamentos de actina para se mover intracelularmente e se espalhar de célula a célula infectando uma vasta extensão de tecidos hospedeiros, sendo o fígado o principal sítio da infecção (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Cada passo da infecção por *L. monocytogenes* requer a expressão de fatores de virulência específicos. (JEMMI; STEPHAN, 2006). Vários fatores já foram descritos, como as internalinas que são responsáveis pela invasão das células epiteliais e pelo tropismo ao tecido. A listeriolisina O (LLO) e duas fosfolipases C (fosfotidilinositol – PI-PLC e fosfotildicolina – PC-PLC) responsáveis pela lise dos fagossomos da célula hospedeira e pela multiplicação intracelular do patógeno. A proteína act-A responsável pela propagação célula a célula, motilidade. Além desses, já foram descritos outros fatores como proteína de ligação da fibronectina (responsável pelo processo de colonização do fígado e intestino), lecitinases e proteases (POSFAY-BARBE; WALD, 2009).

Um dos fatores mais importantes de virulência é a LLO, uma toxina produzida somente pelas cepas virulentas. Por ser uma proteína secretada, sua presença em alimentos pode ser considerada como um indicador da presença de *L. monocytogenes* (CHURCHILL; LEE; HALL, 2006).

As espécies de *Listeria* são ubíquas, podendo ser encontradas em animais domésticos e selvagens, insetos, solo, esgoto e vegetação (RAMASWAMY et al., 2007; JEMMI; STEPHAN, 2006). Além disso, são disseminadas nas fezes de

animais portadores (JEMMI; STEPHAN, 2006) e também podem ser isoladas das fezes de indivíduos saudáveis (RAMASWAMY et al., 2007).

L. monocytogenes pode se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura, de 0 a 45 ºC, e de pH, de 4,5 a 9,2 (NØRRUNG, 2000). O patógeno possui um sistema de resistência à acidez que o faz sobreviver em condições de pH baixo, tanto em alimentos como no estômago (THEVENOT; DERNBURG; VERNOZY-ROZAND, 2006). Além disso, tolera concentrações elevadas de cloreto de sódio, podendo resistir à concentração de 25,5% (DONNELLY, 2001).

Muitos alimentos têm sido implicados em casos de listeriose, como produtos vegetais, leite cru, produtos cárneos e seus derivados, destacando-se os produtos prontos para o consumo (JEMMI; STEPHAN, 2006; MEAD et al., 2006; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

As carnes cruas, particularmente de frango, são importantes fontes de *Listeria* spp., especialmente *L. monocytogenes*. Entretanto, o risco desses alimentos causarem listeriose está relacionado à contaminação cruzada com outros alimentos, cocção inadequada e a possibilidade da bactéria sobreviver após processamento (LIANOU; SOFOS, 2007).

O patógeno ocorre freqüentemente em carnes suínas cruas e tem sido isolado de fezes e pele de porcos aparentemente saudáveis. A freqüência nas fezes desses animais varia de 0 a 47% e as carcaças podem ser contaminadas quando o intestino é rompido durante a evisceração. Contudo, alguns autores acreditam que nem toda cepa de *L. monocytogenes* isolada de carcaça suína tem origem fecal. Etapas de processamento, como refrigeração e retalhamento de carcaças podem ser responsáveis pelo aumento significativo da contaminação pela bactéria (THEVENOT; DERNBURG; VERNOZY-ROZAND, 2006).

No Brasil, há diversos estudos sobre a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, como embutidos cárneos artesanais (SILVA, 1996), carne de frango (BALDASSI et al., 2005; KABUKI, 1997; LAGE, 1993; PELISSER et al., 2001), *blanquet* e presunto de peru (ARAÚJO, 1998), salames (BORGES et al., 1999; SAKATE et al., 2003), lingüiça frescal (DESTRO et al., 1991; VON LAER et al., 2005; MARQUES et al. 2006; MIYASAKI et al., 2009; SILVA et al., 2004), salsicha (ARAGON-ALEGRO et al., 2008; DESTRO et al., 1991; PETTINATTI,

2006;), carne bovina resfriada (COUTINHO, 2004) e carne bovina moída (ALBENONIS, 1991; ARAGON-ALEGRO et al., 2008; MANTILLA et al., 2007; DESTRO et al., 1991). Estes estudos indicam que a freqüência observada do patógeno em produtos de origem animal pode variar desde ausência até 100% de positividade.

Nas indústrias alimentícias a capacidade de *L. monocytogenes* formar biofilmes em superfícies inertes é um fator preocupante. A porcentagem de adsorção do patógeno à superfícies e a extensão da adsorção variam de acordo com o tipo de superfície, pré-tratamento desta superfície, condições ambientais (temperatura, umidade, etc) e sorotipo da bactéria (THEVENOT; DERNBURG; VERNOZY-ROZAND, 2006). Além disso, a bactéria pode multiplicar-se em baixas temperaturas, freqüentemente encontradas nas plantas processadoras de alimentos de origem animal (RAMASWAMY et al., 2007; JEMMI; STEPHAN, 2006). Deste modo, a presença do patógeno nas linhas de processamento, distribuição e estocagem de alimentos, aliado a sua capacidade de se adaptar às condições de estresse, torna seu controle um grande desafio para a indústria de alimentos.

No Brasil, vários estudos sobre *L. monocytogenes* em linhas de processamento de alimentos já foram realizados. Silva et al. (2004) demonstraram a ampla distribuição de *Listeria* spp. em linhas de processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, Rio Grande do Sul. *L. monocytogenes* foi isolada em 29,4% das amostras de matérias-primas utilizadas para fabricação das lingüiças, em 37,5% dos equipamentos e em 16,6% do produto final. Entretanto, Barbalho et al. (2005) encontraram uma prevalência mais baixa de *L. monocytogenes* em uma linha de processamento de frangos na Bahia, tendo relatado positividade em 11,8% das amostras de manipuladores e luvas e, em 14,3% das carcaças após empacotamento. Barros et al. (2007) observaram uma ampla disseminação de *Listeria* spp. nas onze linhas de processamento de carne bovina e derivados estudadas e em um abatedouro localizados no Estado do Paraná. *L. monocytogenes* foi encontrada nos equipamentos (9,2%), instalações (8,7%) e nos produtos finais (17,6%).

Desde o relato do primeiro caso de listeriose em 1981 (SCHLECH et al., 1983), numerosos surtos têm sido documentados no mundo todo (DENNY; McLAUCHLIN, 2008; GOULET et al., 2008; JEMMI; STEPHAN, 2006; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). A listeriose é observada com mais freqüência em países industrializados, pois sofre influência das mudanças no estilo de vida da população que consome cada vez mais alimentos processados do tipo “pronto para consumo”, geralmente conservados em temperatura de refrigeração (ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). A maior ocorrência nos países desenvolvidos pode estar associada ao fato de que nesses países o sistema de notificação de surtos de doenças de origem alimentar é mais organizado e eficiente. Vale ressaltar, no entanto, que a ocorrência verdadeira de casos de listeriose é, certamente, subestimada devido aos sinais clínicos serem semelhantes a uma gripe, acompanhados ou não de manifestações gastrintestinais, levando à conclusão diagnóstica inespecífica e à automedicação (SANTOS et al., 2004).

Na maioria dos países da União Européia, a incidência anual de listeriose é de dois a dez casos notificados por milhão de habitantes. Devido à alta letalidade, as listerioses estão entre as mais freqüentes causas de óbito por ETA nestes países (JEMMI; STEPHAN, 2006). Nos Estados Unidos, estima-se que anualmente ocorram 3.500 casos de listeriose e 500 óbitos decorrentes da doença (RAMASWAMY et al., 2007). Nos últimos anos, os casos de listeriose vêm aumentando mundialmente. Na França, a incidência passou de 3,5 casos por milhão de pessoas no período de 2001 a 2005 para 4,6 casos por milhão em 2006 e 5,6 casos por milhão em 2007 (GOULET et al., 2008).

No Brasil, os relatos clínicos são raros e não há associação com o consumo de alimentos contaminados (HOFER; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1998; HOFER; MELLES; HOFER, 1999; HOFER; RIBEIRO; FEITOSA, 2000; HOFER; REIS; HOFER, 2006; LANDGRAF et al., 1999; SCHWAB; EDELWEISS, 2003; TOYOSHIMA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2008).

1.2 *Salmonella* spp.

A taxonomia de *Salmonella* spp. é complexa e diferentes sistemas podem ser empregados para seu estudo. Entretanto, a nomenclatura adotada por vários centros internacionais de referência para sorotipagem de *Salmonella* reconhece que o gênero é taxonomicamente dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (POPOFF; LE MINOR, 2005). Em 2004, foi proposta a inclusão de uma terceira espécie denominada *S. subterranea*, isolada de sedimento coletado de uma região aqüífera nos Estados Unidos (SHELOBOLINA et al., 2004).

A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies, expressas por nomes e algarismos romanos: *S. enterica* subspécie *enterica* (I), *S. enterica* subspécie *salamae* (II), *S. enterica* subspécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subspécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subspécie *houtenae* (IV) e *S. enterica* subspécie *indica* (VI) (POPOFF; LE MINOR, 2005). Atualmente são conhecidos 2579 sorovares do gênero *Salmonella* (GRIMONT; WEILL, 2007).

A sorotipagem é baseada no esquema de Kauffmann-White e consiste na caracterização dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H). A revisão deste esquema é realizada a cada cinco anos pelo *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella* localizado em Paris, França (POPOFF; LE MINOR, 1997).

Embora todos os sorovares de *Salmonella* devam ser considerados como patogênicos, apenas um número limitado deles é responsável por infecção em humanos e animais. *S. bongori* é raramente isolada de humanos, sendo mais comum em animais de sangue frio e no ambiente (FARMER et al., 1984).

A maioria dos sorovares de *Salmonella* responsáveis pelas enfermidades pertence à espécie *S. enterica* subsp. *enterica*. O grau de adaptação ao hospedeiro varia entre as espécies e pode afetar o homem de três maneiras: a) os sorotipos adaptados ao homem, como a *S.* Typhi, a *S.* Parathyphi A e a *S.* Sendai, que geralmente causam doenças graves como a febre entérica ou tifóide, em geral não são patogênicos aos animais; b) os sorotipos ubíquos, tais como a *S.* Typhimurium podem afetar o homem e animais, causando infecções gastrintestinais de gravidade variada; c) os sorotipos altamente adaptados aos

animais, tais como a *S.* Gallinarum em aves, usualmente não produzem sintomas no homem ou quando ocorrem são brandos (POPOFF; LE MINOR, 2005).

Os principais sintomas das salmoneloses são dor abdominal, diarréia, vômito e febre (D'AOUST; MAURER, 2007) e, em média, ocorrem de 12 a 36 horas após o consumo de água ou alimentos contaminados. Entretanto, esse período de incubação pode variar em função da quantidade de células viáveis ingeridas e do sorovar envolvido (SALYERS; WHITT, 1994). A dose infectante em pessoas saudáveis também varia de acordo com o sorovar e alimento envolvidos, podendo ser de 30 até 10^9 microrganismos (FOLEY; LYNNE, 2008).

As salmoneloses podem ser graves, especialmente em crianças, idosos e imunodeprimidos, uma vez que a bactéria pode atingir a corrente sangüínea e provocar infecções extra-intestinais como septicemia, eritema nodoso, meningite, osteomielite, pneumonia e outras enfermidades (D'AOUST; MAURER, 2007). O risco de doenças invasivas causadas por *Salmonella* (sorovares ubíquos) pode ser de duas a seis vezes mais alto do que o de infecções ocasionadas por outros patógenos de origem alimentar (HELMS; SIMONSEN; MØLBAK, 2006), assim como é maior também a ocorrência de óbitos (HUGHES; GILLESPIE; O'BRIEN, 2007).

Salmonella spp. entram no hospedeiro via rota fecal-oral, sobrevivem no ambiente de baixo pH no estômago e são capazes de colonizar múltiplos sítios do epitélio intestinal. Normalmente, o quadro diarréico resultante é moderado, sem a presença de sangue nas fezes. Entretanto, em alguns casos, pode ocorrer perda de um pequeno volume de fezes, tenesmo e sangue. O transporte através do retículo-endotelial e a capacidade de multiplicação do patógeno no interior dos macrófagos possibilitam sua disseminação no organismo. Na maioria dos casos, a doença é autolimitada, mas o tratamento com antimicrobianos pode ser necessário em casos mais graves (FOLEY; LYNNE, 2008).

Nos últimos anos, houve um aumento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antimicrobianos, principalmente as multi-resistentes, causando grande preocupação pela possível transmissão dessas cepas por toda a cadeia alimentar e também como reservatório de elementos genéticos relacionados à

resistência aos antimicrobianos que podem ser transferidos para outras bactérias entéricas (CALLAWAY et al., 2008).

A capacidade de *Salmonella* spp. causar a doença depende de vários fatores de virulência, como plasmídeos, toxinas, fimbrias e flagelos. Embora os elementos genéticos envolvidos na virulência não estejam suficientemente esclarecidos, sabe-se que a maioria dos genes de virulência localiza-se em regiões específicas do cromossomo bacteriano, denominadas de ilhas de patogenicidade (*Salmonella* Pathogenicity Island – SPI) (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005). Até o momento, já foram descritas doze SPI diferentes. Esses genes estão associados com a capacidade de invasão da célula hospedeira e patogênese intracelular (PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006). Acredita-se que esses genes tenham sido adquiridos de outras espécies bacterianas por transferência genética horizontal (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

Salmonella spp. são microrganismos mesófilos, mas algumas cepas são capazes de se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura 5,5 ºC a 49,5 ºC, podendo sobreviver em alimentos sob refrigeração e congelamento (RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009). Essas bactérias têm ampla capacidade de disseminação, tendo como habitat primário o trato intestinal de mamíferos, anfíbios, répteis, aves e insetos. Tanto o homem como animais podem excretar esses microrganismos, que podem sobreviver por longos períodos no ambiente (PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006). Além disso, salmonelas têm sido detectadas em uma grande variedade de alimentos, com maior incidência em produtos cárneos, ovos e derivados (PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006; SWITT et al., 2009).

No Brasil, há uma grande variação na ocorrência de *Salmonella* spp. em produtos cárneos. Estudos realizados em diferentes regiões do país mostraram freqüências entre 5,9% e 50% em carcaças de frango (CARVALHO; CORTEZ, 2005; FUZIHARA; FERNANDES; FRANCO, 2000; MATHEUS; RUDGE; GOMES, 2003; RISTORI et al., 2008; SANTOS et al., 2000; TIROLLI; COSTA, 2006; VESSONI, 2004); entre 10,48% e 39,3% em cortes comerciais de frango (BAÚ; CARVALHAL; ALEIXO, 2001; CARVALHO; CORTEZ, 2005; COSTA, 1996; RIBEIRO et al., 2007); entre 7,5% e 24,8% em lingüiças (CARVALHO; CORTEZ,

2005; CORTEZ, 2003; MÜRMANN; SANTOS, CARDOSO, 2009; SPRICIGO et al., 2008); entre 3,24% e 6% em salsichas de frango (LUIZ et al., 2004; MARTINS et al., 2008) e 25% em carne de aves mecanicamente separada (CARVALHO; CORTEZ, 2005).

A introdução de *Salmonella* spp. na cadeia de produção de animais de criação pode ocorrer através de outros animais infectados, animais silvestres, água e ração, e sua permanência depende das condições ambientais. Nos animais abatidos, a contaminação de carcaças com material intestinal/fecal é a principal causa de infecções humanas de origem alimentar (PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006).

A carne suína e derivados são considerados fontes importantes de *Salmonella* spp. em alguns países (LO FO WONG et al., 2002; FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2008), sendo superados apenas pelos produtos de origem avícola. A contaminação de aves e suínos com a bactéria pode ocorrer antes do processamento e também através da contaminação cruzada nas plantas de processamento (FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2008).

Os dados de prevalência de *Salmonella* spp. em carne bovina são bastante variáveis, dependendo de uma série de fatores, tais como condições climáticas, forma de manejo do gado, condições de abate e condições de armazenamento das carcaças. Nas fezes de bovinos a ocorrência do microrganismo pode ser baixa (0,2% a 5,5%), entretanto em amostras de couro de bovinos já foram observadas freqüências elevadas, de até 97,7%. Em carne bovina moída, prevalências de *Salmonella* spp. podem variar de 0,4 a 4% (RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009). Freqüentemente, a contaminação de carne bovina pelo patógeno ocorre por contaminação cruzada e falhas nas práticas de higiene alimentar, o que dificulta a identificação da fonte original.

Nos últimos anos, o número de surtos causados por salmonela vem aumentando consideravelmente, tanto em países em desenvolvimento como nos desenvolvidos. *Salmonella* spp. é um dos patógenos mais freqüentemente associados à doenças de origem alimentar, em países como: Áustria (MUCH et al., 2009); Brasil (GEIMBA et al., 2004; JAKABI et al., 1999; NADVORNY; FIGUEIREDO; SCHMIDT, 2004; TAVECHIO et al. 2002; VAN AMSON;

HARACEMIV; MASSON, 2006); Estados Unidos (GERNER-SMIDT; WHICHARD, 2007); Espanha (DOMÍNGUEZ et al., 2007); Inglaterra e Gales (HUGHES; GILLESPIE; O'BRIEN, 2007); Japão (KUBOTA et al., 2008), e outros (GREIG; RAVEL, 2009).

Os sorovares associados às infecções humanas variam de acordo com a região estudada, entretanto os mais comuns são *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium (GALANIS et al., 2006).

No Brasil, no Estado de São Paulo, no período de 1996 a 2003, o sorovar com maior prevalência em amostras clínicas foi *S.* Enteritidis seguido dos sorovares *S.* Typhimurium, *S.* Agona, *S.* Typhi e *S. enterica* subsp. *enterica* 4,[5],12:i:- (FERNANDES et al., 2006). Em alimentos, o sorovar mais freqüentemente isolado também é *S.* Enteritidis (TAVECHIO et al., 1996; TAVECHIO et al., 2002; MÜRMANN; SANTOS, CARDOSO, 2009).

Nos Estados Unidos, os sorovares comumente encontrados nas infecções humanas, desde 1995, são *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *S.* Newport e *S.* Heidelberg. Em 2004, o sorovar *S.* Javiana passou a ser um dos mais comuns, substituindo *S.* Heidelberg (CDC, 2008). Na União Européia, o sorovar predominante é *S.* Enteritidis e em alguns países da Ásia, *S.* Choleraesuis (CHIU; SU; CHU, 2004; FOLEY; LYNNE, 2008; GREIG; RAVEL, 2009).

Galanis et al. (2006) compilaram dados de isolamento de cepas de *Salmonella* spp. nos países participantes do WHO Global Salm-Surv (programa da OMS para reduzir a gravidade global de ETA), no período de 2000 a 2004, verificando que o sorovar de maior prevalência em amostras humanas foi *S.* Enteritidis e em amostras não humanas, *S.* Typhimurium.

1.3 *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* é composto por 18 espécies. As espécies patogênicas ao homem são termofílicas, multiplicando-se bem em temperaturas mais elevadas, de 46 ºC (máxima) a 30 ºC (mínima). Entre as espécies termofílicas, *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*, são responsáveis pela maioria das infecções entéricas. *C. jejuni* é a espécie mais comum, responsável por 80 a 85% dos casos, enquanto *C. coli* é responsável por 10 a 15% (MOORE et al., 2005). Entretanto, em países em desenvolvimento, *Campylobacter upsaliensis* também é considerado relevante (HUMPREY; O´BRIEN; MADSEN, 2007).

Campylobacter spp. são microaerófilos, requerem cerca de 10% de CO_2 e 5% de O_2 para sua multiplicação (HUMPREY; O´BRIEN; MADSEN, 2007). Esses microrganismos são sensíveis às concentrações acima de 1,5% de cloreto de sódio e ao congelamento, podendo ser inativados à temperatura ambiente. Apesar da sobrevivência de *Campylobacter* spp. ser maior sob temperaturas de refrigeração (4 ºC) do que as de congelamento, esses microrganismos podem sobreviver à - 22 ºC por até 84 dias (SAMPERS et al., 2010).

O período de incubação da infecção por *Campylobacter* spp., a campilobacteriose, é de dois a cinco dias, podendo chegar até dez dias. Os sintomas variam de diarréia profusa aquosa (*cholera-like*) à diarréia sanguinolenta, contendo muco e células sanguíneas brancas (*dysentery-like*). Aproximadamente metade dos pacientes com a infecção inicialmente tem febre, mal estar, mialgia e dor abdominal, e posteriormente apresentam diarréia sanguinolenta. Estima-se que a dose infectante seja baixa, em torno de 400 a 500 células (BUTZLER, 2004; PADUNGTON; KANEENE, 2003).

Quando a campilobacteriose não é grave, raramente é indicado tratamento com antibióticos. Entretanto, o relato de cepas resistentes às drogas utilizadas para o tratamento clínico, especialmente os macrolídeos e as fluoroquinolonas, vem aumentando (HUMPREY; O´BRIEN; MADSEN, 2007).

Diversas complicações locais, como colecistite, pancreatite, peritonite e hemorragia gastrointestinal maciça, decorrentes da disseminação direta da bactéria pelo trato intestinal, podem ocorrer. As manifestações extra-intestinais são raras, mas *Campylobacter* spp. podem estar associados à meningite, endocardite, artrite séptica, osteomielite, septicemia neonatal (ALLOS, 2001) e miopericardite (ALZAND et al., 2010). Menos de 1% dos pacientes com a infecção podem desenvolver bacteremia, sendo mais comum, em pacientes imunocomprometidos, crianças e idosos. A letalidade da campilobacteriose é baixa, aproximadamente 0,05 óbitos por 1000 infecções (ALLOS, 2001), entretanto o risco de mortalidade é maior em pacientes idosos e crianças e, naqueles pacientes em que a doença passa despercebida (CRUSHELL et al., 2004).

A seqüela mais importante da campilobacteriose, principalmente por *C. jejuni*, é a síndrome de Guillain-Barré (GBS) (HELMS; SIMONSEN; MØLBAK, 2006; NACKAMKIN, 2002). A GBS é uma doença auto-imune aguda caracterizada pela desmielização do sistema nervoso periférico, causando paralisia ascendente que pode afetar os nervos periféricos e craniais (ZILBAUER et al., 2008). Os lipooligossacarídeos (LOS) da bactéria provocam a formação de anticorpos reativos contra a mielina dos nervos periféricos do paciente, por mimetismo molecular, causando inflamação e dano no tecido muscular. Nos Estados Unidos, estima-se que a doença afeta de um a dois indivíduos por 100.000 pessoas, a cada ano (ALLOS, 2001). A GBS é considerada a causa mais comum de paralisia flácida, uma vez que a poliomielite está praticamente erradicada (NACKAMKIN, 2002). Outra variante da GBS é a síndrome de Miller Fisher, caracterizada por oftalmoparesia (disfunção oculomotora), ataxia (disfunção nervosa sensorial periférica) e arreflexia (ausência de reflexos) (MEAD et al., 1999).

Segundo Gradel et al. (2009), pacientes que tiveram infecção por *Salmonella* não-tifóide ou *Campylobacter* têm um alto risco de evoluir para doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Essas doenças são distúrbios crônicos, com inflamação do intestino que pode provocar cólicas abdominais e diarréia recorrentes.

Na maioria dos países desenvolvidos, *Campylobacter* spp. é o principal responsável pelas infecções zoonóticas entéricas humanas (HELMS; SIMONSEN; MØLBAK, 2006). A campilobacteriose atinge indivíduos de todas as idades, ocorrendo com maior freqüência em crianças abaixo de quatro anos e adultos jovens de 15 a 44 anos. A doença tem variação sazonal, tendo maior ocorrência nos meses mais quentes do ano (FRIEDMAN et al., 2000). Os principais sintomas são diarréia sanguinolenta com muco e a doença é autolimitada (YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007). Indivíduos portadores de HIV têm maior chance de ter infecções por *Campylobacter* spp. e também da doença evoluir para complicações extra-intestinais. Muitos casos de campilobacteriose (3 a 50%) são associados com diarréia do viajante e resultam do consumo de água ou alimentos contaminados (BUTZLER, 2004). Carnes cruas ou mal cozidas, hambúrgueres, lingüiças e ostras já foram alimentos implicados em surtos por *Campylobacter* spp. (BUTZLER, 2004; HORROCKS et al., 2009).

Em países em desenvolvimento, a maioria das infecções ocorre em crianças e não há relatos de variação sazonal da doença. A infecção é associada às condições higiênico-sanitárias precárias, tendo como sintoma principal a diarréia aquosa (YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007). *Campylobacter* spp. é o agente mais comum de diarréia em crianças com menos de dois anos de idade (COKER et al., 2002), sendo freqüentemente detectado em amostras clínicas concomitantemente com outros patógenos entéricos (ALBERT et al., 1999).

As razões para a disparidade de efeitos da campilobacteriose nos países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento não estão esclarecidas. Entretanto, acredita-se que pode ser decorrente dos diferentes níveis de imunidade pré-existentes, provenientes de diferentes estímulos ambientais naturais de cada região (YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007).

Embora os mecanismos pelos quais *Campylobacter* spp. causa a doença ainda não sejam totalmente compreendidos, sabe-se que vários fatores de virulência podem estar envolvidos, tais como: a toxina citoletal distensora (CDT), adesinas, proteínas de invasão, cápsulas, flagelos e lipooligossacarídeos. A dificuldade no esclarecimento da patogênese deve-se, principalmente, à falta de um modelo animal adequado para a reprodução da doença humana (POLY;

GUERRY, 2008; YOUNG; DAVIS; DiRITA, 2007; ZILBAUER et al., 2008). O entendimento da patogênese é também dificultado pela variabilidade genética das cepas (POLY; GUERRY, 2008).

Quando encontram condições adversas, tais como escassez de nutrientes, *Campylobacter* spp. podem apresentar um estágio denominado “viável mas não cultivável” (VBNC - *Viable But Not Culturable*). Nessa situação, a forma das células muda de espiralada para cocóide e a bactéria não é detectada pelos métodos microbiológicos convencionais (ROLLINS; COLWELL, 1986). Ainda não se conhece o papel das células VBNC na patogênese de *Campylobacter* spp. (MURPHY; CARROLL; JORDAN, 2006). Um ponto importante é que *C. jejuni* que forma biofilmes pode entrar no estágio VBNC, favorecendo sua proteção contra os fatores de estresse ambiental (TRACHOO; FRANK; STERN, 2002).

Campylobacter spp. sobrevivem mal em superfícies secas (HUMPHREY; MASON; MARTIN, 1995), mas podem formar biofilmes em superfícies de vidro, poliestireno e aço inoxidável. A formação de biofilmes pode favorecer a manutenção da bactéria em ambientes inóspitos (GUNTHER IV; CHEN, 2009). Em ambientes aviários, os biofilmes formados nos sistemas hidráulicos podem ser fontes importantes do patógeno (TRACHOO; FRANK; STERN, 2002).

Apesar do risco de transmissão de *Campylobacter* spp. pessoa-pessoa ser mínimo (ZILBAUER et al., 2008), a transmissão direta pode ocorrer entre profissionais ocupacionais, tais como açougueiros, fazendeiros, funcionários de abatedores e processadores de frango. Pode ocorrer também transmissão perinatal, em pacientes não necessariamente sintomáticos, durante o nascimento ou nos primeiros dias de vida do recém-nascido (BUTZLER, 2004).

Todos os animais, inclusive os domésticos, podem ser portadores do patógeno, mas as aves, particularmente os frangos, constituem a maior fonte de transmissão da infecção ao homem (BUTZLER, 2004). O consumo de carne de frango e derivados inadequadamente processados é o principal fator de risco na campilobacteriose humana (HUMPHREY; O´BRIEN; MADSEN, 2007; MOORE et al., 2005). Na maioria dos países, a freqüência de *Campylobacter* spp. em carne de frango é de no mínimo 50% (SUZUKI; YAMAMOTO, 2009), podendo chegar a 100% (HUMPHREY; O´BRIEN; MADSEN, 2007).

As vias de transmissão de *Campylobacter* spp. em frangos comerciais antes do abate ainda não são totalmente esclarecidas. Entretanto, esta contaminação pode aumentar em decorrência da contaminação cruzada durante as etapas de abate e processamento (MOORE et al., 2005).

Em carne bovina, a espécie prevalente é *C. jejuni*, enquanto na carne suína a prevalência é de *C. coli* (HORROCKS et al., 2009). A freqüência do patógeno em carnes bovina e suína geralmente é baixa, e inferior a 10%, devido à manutenção prolongada das carcaças em temperatura de refrigeração antes do processamento e à redução do número de bactérias ao longo das várias etapas do processamento (HUMPHREY; O´BRIEN; MADSEN, 2007; MEDEIROS et al., 2008; TAREMI et al., 2006; WONG et al., 2007).

As informações sobre a ocorrência de *Campylobacter* spp. em animais de corte e alimentos de origem animal em países em desenvolvimento ainda são muito limitadas (PADUNGTON; KANEENE, 2003). No Brasil, os estudos publicados referem-se à detecção de *Campylobacter* termofílicos em carne de frango, especialmente carcaças de frango recém-abatidas (DIAS et al., 1990; PINHEIRO, 1991), cortes de frango (AQUINO et al., 1996), carcaças de frango adquiridas diretamente de uma planta processadora de frangos (AQUINO et al., 2002) e, em amostras de carcaças (AUGUSTO FILHO, 2001) e cortes de frango (CARVALHO; CORTEZ, 2003; SAKUMA; FRANCO; FERNANDEZ, 1992) comercializados no varejo. Não foram encontrados estudos referentes à detecção da bactéria em produtos cárneos de origem bovina e suína.

1.4 *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA DE SHIGA (STEC)

Escherichia coli faz parte da flora intestinal do homem e animais de sangue quente. Entretanto, certos subgrupos de *E. coli* apresentam fatores de virulência que os tornam capazes de causar doenças intestinais e extra-intestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Em função das manifestações clínicas, fatores de virulência e mecanismos pelos quais causam a doença, os subgrupos de *Escherichia coli* responsáveis por diarréia podem ser subdivididos em seis patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga ou verotoxigênica (STEC ou VTEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Há também patotipos não causadores de diarréia, mas que causam infecções extra-intestinais (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000), septicemia e meningite (MNEC) e, infecções extra-intestinais em unidades de tratamento intensivo (UPEC) (CAPRIOLI et al., 2005; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Dentre as *E. coli* diarreiogênicas, o patotipo emergente em alimentos e de maior relevância é o formado pela *E. coli* produtora de toxina de Shiga. Essas bactérias são capazes de causar um amplo espectro de doenças no homem, que variam desde uma diarréia branda até doenças severas como colite hemorrágica (CH), os quais podem evoluir para complicações extra-intestinais graves, como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e a Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) (NATARO; KAPER, 1998).

A principal característica das cepas de STEC é a produção de um ou mais tipos de citoxina, denominadas verotoxinas, nome originado do efeito citopático sobre células Vero (linhagem celular de rim de macaco verde africano) (KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC, 1977). Essas toxinas são também chamadas de toxinas de Shiga (Stx) devido à semelhança com a toxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (O´BRIEN et al., 1982). Até o momento, são conhecidos dois grupos antigenicamente distintos de toxinas de Shiga (Stx1 e Stx2), codificados por genes diferentes, mas que apresentam a mesma estrutura

molecular e atividade biológica. A toxina Stx1 é semelhante à toxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 e possui duas variantes Stx1c (ZHANG et al., 2002) e Stx1d (BÜRCK et al., 2003). A Stx2 apresenta homologia inferior a 60% na seqüência de aminoácidos de Stx1 (JACKSON et al., 1987), sendo conhecidas cinco variantes: Stx2c (SCHMITT; MCKEE; O'BRIEN, 1991), Stx2d (PIÉRARD et al., 1998), Stx2e (WEINSTEIN et al., 1988), Stx2f (SCHMIDT et al., 2000) e Stx2d elastase (mucus)-ativável (Stx2d atv.) (MELTON-CELSA; DARNELL; O'BRIEN, 1996).

Os genes *stx1* e *stx2*, responsáveis pela produção das toxinas Stx1 e Stx2 respectivamente, estão localizados no genoma de um bacteriófago que se integra no cromossomo das STEC. A presença destes genes em fagos permite a sua disseminação entre diferentes estirpes, assim como possibilita que os genes coexistam em uma mesma bactéria, desta forma, as STEC podem apresentar um ou mais genes *stx* simultaneamente (PATON; PATON, 1998a).

Embora o principal fator de virulência das STEC seja a produção de um ou mais tipos de Stx (Stx1, Stx2 ou variantes), outros fatores associados à doença humana já foram descritos (GYLES, 2007) e são freqüentemente utilizados para caracterizar um subgrupo de STEC, formado pelas *E. coli* entero-hemorrágicas (EHEC) (CAPRIOLI et al., 2005).

As cepas dos grupos de EHEC e EPEC possuem um gene *eae*A responsável pela produção de uma proteína externa de membrana, a adesina intimina, que causa uma alteração na membrana celular denominada lesão A/E (*attaching and effacing*). Essa lesão caracteriza-se pela perda das microvilosidades do enterócito, causada pela adesão íntima da bactéria à superfície das células do epitélio intestinal, levando a um rearranjo do citoesqueleto na região onde a bactéria adere, formando um pedestal. A capacidade de induzir a lesão A/E é codificada por genes contidos numa ilha de patogenicidade, conhecida como região LEE (*Locus of Enterocyte Effacement)* (JERSE; KAPER, 1991). Evidências recentes demonstram que as infecções por STEC/EHEC envolvem várias moléculas efetoras codificadas por outras ilhas de patogenicidade não pertencentes à região LEE (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2009). A presença do gene *stx2* está associada a um risco maior de

desenvolvimento de SHU e a presença simultânea de *stx2* e *eae*A em uma cepa, pode ser um prognóstico para a ocorrência de SHU (ETHELBERG et al., 2004).

Outro fator de virulência em cepas de EHEC é a produção de uma enterohemolisina (EHEC-Hly ou Ehx), utilizada como marcador de patogenicidade (BEUTIN et al., 1989). Essa enterohemolisina é codificada pelo gene *hly*, também denominado por alguns autores de gene *ehxA*, contido em um plasmídio de virulência (pEHEC) de 60-Mda. A enterohemolisina é uma proteína que atua destruindo eritrócitos, leucócitos, células endoteliais, granulócitos, monócitos e linfócitos T humanos, através da formação de pequenos poros. Apesar de haver uma forte associação entre a produção de enterohemolisina e de Stx com a colite hemorrágica e a SHU (SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995), o papel da enterohemolisina na patogenicidade de cepas de EHEC não está elucidado (MAINIL; DAUBE, 2005; SAITOH et al., 2008). A liberação de hemoglobina dos eritrócitos pela ação da enterohemolisina pode ser uma explicação para o papel de *ehx*A na patogênese EHEC, pois o ferro da hemoglobina age estimulando a multiplicação do microorganismo no hospedeiro (SAITOH et al., 2008).

Além dos genes *ehxA*, outros genes podem estar presentes no plasmídeo de EHEC (pEHEC). Um deles é o gene *etp*, responsável por um sistema de secreção. O plasmídeo pEHEC que contém os genes *ehx*A e *etp* está presente em todas as cepas de *E. coli* O157:H7, na maioria das cepas de O26:H11 e em outros sorotipos de EHEC (MAINIL; DAUBE, 2005).

Atualmente, o termo STEC é utilizado para as cepas de *E. coli* que produzem Stx, enquanto que o termo EHEC caracteriza cepas de *E. coli* que produzem Stx e induzem a lesão A/E ou carregam as informações genéticas que codificam esses fatores de virulência. Como nem todas as cepas de EHEC causam colite hemorrágica, alguns autores não aceitam essa nomenclatura (MAINIL; DAUBE, 2005).

O período de incubação da enfermidade causada por STEC é de três a quatro dias, mas pode prolongar-se até oito dias ou ser breve, de um a dois dias. No início da enfermidade, a diarréia não é sanguinolenta e é precedida de dor abdominal e febre de curta duração, podendo ocorrer vômitos. Após dois dias, a diarréia se torna sanguinolenta e a dor abdominal piora. Este estágio costuma

durar em torno de quatro a dez dias e na maioria dos pacientes não há seqüelas (NATARO; KAPER, 1998).

Em 10% dos pacientes, principalmente crianças abaixo de 10 anos e idosos, a doença pode evoluir para SHU (NATARO; KAPER, 1998). A toxina de Shiga causa danos crônicos ao rim, levando à necessidade de diálise e até de transplante renal. SHU é caracterizada pela formação de microtrombos, trombocitopenia e anemia hemolítica (TARR; GORDON; CHANDLER, 2005).

O consumo de água ou alimentos contaminados, o contato direto e indireto com animais infectados, e a disseminação pessoa-pessoa constituem as principais vias de transmissão das STEC. Portadores humanos já foram relatados e podem ser fontes de contaminação. A dose infecciosa estimada é extremamente baixa, inferior a 100 células (CAPRIOLI et al., 2005; MAINIL; DAUBE, 2005).

Dentre as STEC, o sorotipo O157:H7 é o que apresenta maior expressão epidemiológica. Este sorotipo foi reconhecido como patógeno em 1982, quando foi associado a dois surtos de colite hemorrágica de origem alimentar nos Estados Unidos (RILEY et al., 1983). Os surtos foram relacionados ao consumo de hambúrgueres de carne bovina. *E. coli* O157:H7 foi isolada de hambúrguer cru, congelado, pertencente ao mesmo lote do envolvido em um dos surtos (WELLS et al., 1983).

Desde então, vários surtos e casos esporádicos de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica causados por STEC têm sido reportados mundialmente (ERICKSON; DOYLE, 2007), principalmente em países industrializados do hemisfério norte, mas também há relatos em países do hemisfério sul, como na África do Sul (EFFLER et al., 2001), Brasil (GUTH et al., 2002), Austrália (NATARO; KAPER, 1998), Chile (PRADO; CAVAGNARO, 2008) e Argentina (RIVAS et al., 2006).

Diversos alimentos, tais como salames, leite cru, queijos, sucos não pasteurizados, melão e vegetais, já foram incriminados em surtos de STEC (GYLES, 2007; KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2009), entretanto o maior risco está associado ao consumo de carne bovina (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2009; NATARO; KAPER, 1998). Estes microrganismos são encontrados no trato

intestinal de diferentes espécies de animais domésticos e selvagens, sendo os ruminantes o principal reservatório. O gado é considerado o reservatório primário (CERQUEIRA et al., 1999, CAPRIOLI et al., 2005) e os animais freqüentemente carregam cepas de STEC sem apresentar sintomatologia. *E. coli* O157 é considerada transitória da flora intestinal do gado e sua presença nas fezes parece ser influenciada pela idade do animal e pela sazonalidade, sendo maior nos meses quentes (CAPRIOLI et al., 2005). As cepas de STEC podem sobreviver por longos períodos nas fezes de animais, em água contaminada, solo e superfícies de aço inoxidável e plástico (ERICKSON; DOYLE, 2007).

A maioria dos países europeus relata uma freqüência de 0 a 4% de cepas O157:H7 e outras STEC em carcaças bovinas e produtos bovinos crus. Nos Estados Unidos, freqüências mais elevadas (acima de 36%) já foram encontradas. Em frangos e suínos, a presença de *E. coli* O157 é rara, mas a freqüência de isolamento de cepas STEC não O157 pode variar de 1 a 50% (MAINIL; DAUBE, 2005).

Embora *E. coli* O157:H7 seja o patógeno mais conhecido deste grupo, mais de 400 diferentes sorotipos de STEC, designados de STEC não-O157 já foram descritos (BLANCO et al., 2004). Os mais comumente associados com a infecção no homem são: O26, O103, O111, O113 (KARMALI et al., 2003; MAINIL;DAUBE, 2005; VAZ et al., 2004; NATARO; KAPER, 1998), O48, O91(KARMALI et al., 2003; MAINIL; DAUBE, 2005), O104 (MAINIL; DAUBE, 2005) e O121, O145, (KARMALI et al., 2003). A ocorrência dos diferentes sorotipos de STEC pode variar conforme a região geográfica (MAINIL; DAUBE, 2005).

No Brasil, as infecções humanas causadas por STEC, geralmente, são restritas a casos esporádicos de diarréia não sanguinolenta, particularmente em crianças e pacientes portadores de HIV. Os sorotipos mais comuns nestas infecções foram O26:H11, O111:NM e O111:H8 (GIRALDI et al., 1990; IRINO et al., 2007; VAZ et al., 2004).

O primeiro isolamento de *E. coli* O157:H7 em amostras clínicas no Brasil foi relatado por Irino et al. (2002). A cepa foi isolada em 1990 de uma paciente de 18 anos de idade que apresentou diarréia e era portadora do vírus HIV. Já o primeiro relato de isolamento de cepa de STEC relacionada com Síndrome Hemolítica

Urêmica, ocorreu em 2001, em São Paulo. *E. coli* O26:H11 era produtora de *stx1*, *eae* e enterohemolisina, e foi isolada de um paciente de oito meses de idade (GUTH et al., 2002).

Apesar da baixa freqüência de infecções humanas causadas por STEC no Brasil, cepas de STEC têm sido detectadas, principalmente, em amostras de fezes de bovinos (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; CERQUEIRA et al., 1999; FARAH et al., 2007; LEOMIL et al., 2003; RIGOBELO et al., 2006; TIMM et al., 2007) e carcaças de bovinos (RIGOBELO et al., 2008). Cerqueira et al. (1999) descreveram o primeiro isolamento de *E. coli* O157:H7 no Brasil, procedente de *swab* retal de gado, no Estado do Rio de Janeiro. Dados de isolamento de STEC em alimentos são extremamente limitados (BERGAMINI et al., 2007; CERQUEIRA; TIBANA; GUTH, 1997; RODOLPHO; MARIN, 2007) e não foram encontrados relatos sobre a pesquisa dessas bactérias em amostras de carnes suínas e de aves.

2. OBJETIVOS

Considerando a exigüidade de dados sobre positividade e níveis de contaminação de produtos cárneos no comércio varejista de São Paulo com *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), desenvolveu-se o presente trabalho com os seguintes objetivos:

- Investigar a presença de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) em produtos cárneos (salsicha bovina, lingüiça suína, carne bovina moída e coxa de frango) refrigerados comercializados no município de São Paulo.

- Quantificar *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. nas amostras analisadas.

- Determinar os sorotipos das cepas de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. isoladas das amostras de produtos cárneos.

- Correlacionar a contagem de microrganismos indicadores de higiene (coliformes termotolerantes) com a presença de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) nas amostras de produtos cárneos estudados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

O estudo foi conduzido com 552 amostras de produtos cárneos, sendo 138 de salsicha bovina, 138 de lingüiça suína crua, 138 de carne bovina moída crua e 138 de coxa de frango crua, comercializadas a granel em supermercados e hipermercados do município de São Paulo, SP. Todas as amostras se encontravam dentro do período de validade e armazenadas sob refrigeração, em temperaturas entre 0 ºC e 6 ºC.

A coleta das amostras foi realizada no período de maio de 2008 a julho de 2009, e feita por fiscais da sub-gerência da Gerência de Vigilância Sanitária de Produtos e Serviços de Interesse à Saúde, da Coordenação de Vigilância em Saúde (COVISA) – Prefeitura do Município de São Paulo. Após a coleta, as amostras eram transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas e mantidas sob refrigeração até o momento da análise (máximo 18 horas).

3.1.1. Amostragem

O cálculo do número de amostras a ser analisado foi realizado com base em dados disponíveis na literatura com relação à ocorrência dos microrganismos estudados em produtos cárneos. Assim, considerando o fato que em diversos estudos brasileiros há diferenças nas prevalências de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos e, ainda, que para um mesmo patógeno a prevalência pode variar de acordo com o tipo de produto, a amostragem foi calculada pressupondo-se uma prevalência de 10% para todos os patógenos, nos diferentes produtos cárneos (margem de erro de 5% e nível de confiança de 95%), resultando em 552 amostras.

Para assegurar uma coleta de amostras representativa das regiões de São Paulo, utilizou-se uma lista de supermercados e hipermercados do município

fornecida pela Prefeitura de São Paulo. E de acordo com a estratificação destes supermercados e hipermercados por região, foram sorteados 138 estabelecimentos, localizados em 77 bairros do município de São Paulo. Portanto, considerando que o município de São Paulo tem 97 bairros (IBGE, 2009), a amostragem cobriu 80,2% do município de São Paulo.

3.2 MÉTODOS

As análises microbiológicas foram realizadas na Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

3.2.1 Preparo das amostras

De cada amostra foram retiradas, assepticamente, quatro porções de 25 gramas e cada porção foi transferida para uma bolsa de polietileno estéril (Nasco, EUA).

3.2.2 Meios de cultura

Os meios de cultura empregados foram da marca Oxoid (Basingstoke, Inglaterra), exceto quando especificado.

3.2.3 Detecção de *Listeria monocytogenes*

Para detecção de *Listeria monocytogenes* nas amostras de produtos cárneos foi utilizada a metodologia descrita no *International Organization for Standardization* (ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004). Uma alíquota de 25 g de cada amostra foi homogeneizada com 225 mL de caldo Half-Fraser em *stomacher* (Seward 400 – London, UK) por 60 segundos em bolsa plástica, seguido de incubação a 20 ± 2 ºC por 1 h ± 5 min.

Após esse período, adicionou-se ao homogeneizado um frasco de suplemento Half-Fraser SR0166 (Oxoid, Inglaterra) contendo 2,25 mg de ácido nalidíxico, 2,8125 mg de hidrocloreto de acriflavina e 112,5 mg de citrato férrico de amônio, incubando-se a 30 ± 1 ºC por 24 ± 2 h. Em seguida, transferiu-se 0,1 mL do caldo para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser, incubando-se a 35 ± 1 ºC por 48 ± 2 h. Os tubos que apresentavam enegrecimento foram estriados em ágar Palcam e ágar *Listeria* de acordo com Ottaviani and Agosti (ALOA), seguido de incubação a 35 ± 1 ºC por 24 a 48 h.

De cada placa de ágar Palcam e ALOA, três a cinco colônias suspeitas de *Listeria* foram repicadas em ágar tripticase de soja com 0,6% de extrato de levedura (TSAye). Após a incubação a 35 ± 1 ºC por 18 a 24 h, as placas foram examinadas sob a técnica de iluminação oblíqua transmitida (técnica de Henry) para seleção de colônias características de *Listeria*, as quais foram transferidas para outra placa com ágar TSAye para obtenção de colônias isoladas. Estas colônias foram submetidas à coloração de Gram e testes para produção de catalase e β-hemólise, fermentação de carboidratos (xilose, manitol e ramnose) e motilidade. O resultado foi expresso como ausência ou presença de *L. monocytogenes* em 25 g do produto cárneo.

A metodologia empregada para pesquisa de *Listeria monocytogenes* nos produtos cárneos analisados está esquematizada na Figura 1.

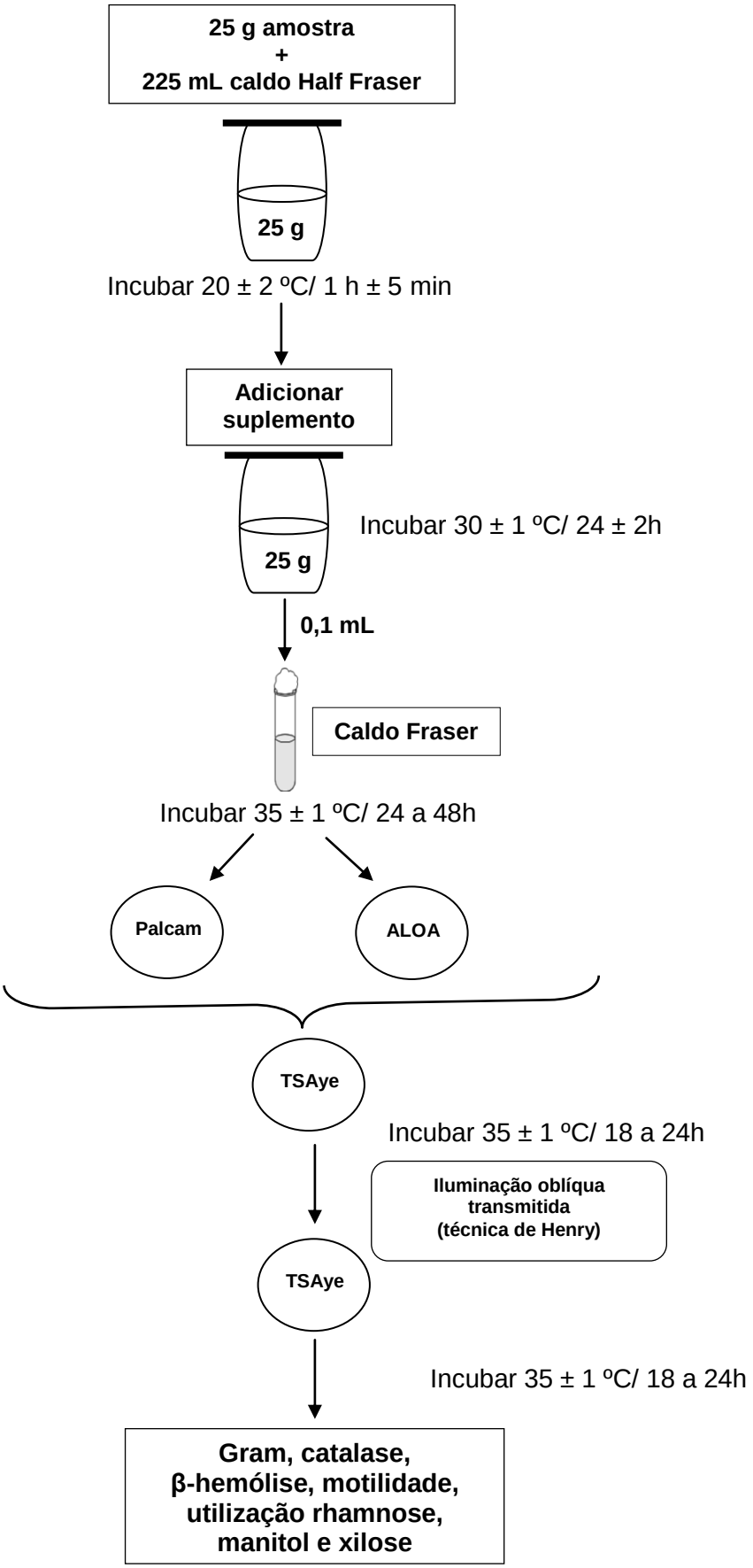

Figura 1 - Esquema da metodologia empregada para detecção de *Listeria monocytogenes*.

3.2.4 Enumeração de *Listeria monocytogenes*

Para enumeração de *Listeria monocytogenes* nas amostras de produtos cárneos foi utilizada a metodologia descrita no *International Organization for Standardization* (ISO 11290-2:1998), utilizando-se o homogeneizado preparado para detecção de *L. monocytogenes* descrito no item 3.2.3.

Semeou-se 0,4 mL, 0,3 mL e 0,3 mL do homogeneizado (item 3.2.3) na superfície de cada uma das placas de Petri contendo ágar Palcam e ALOA e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, realizou-se o espalhamento dos inóculos por toda a superfície dos meios. Adicionalmente, alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} (preparadas a partir do homogeneizado inicial em 9 mL de água peptonada tamponada à 1%) foram semeadas em placas contendo ágar Palcam e ALOA. As placas foram incubadas a 35 ± 1 ºC por 24 a 48 h.

De cada placa de Agar Palcam e ALOA, três a cinco colônias suspeitas de *Listeria* foram submetidas aos procedimentos de identificação de *L. monocytogenes* descritos no item 3.2.3.

As contagens de *L. monocytogenes* foram calculadas de acordo com as diluições efetuadas e expressas em unidades formadoras de colônias por grama do produto cárneo (UFC/g).

A metodologia empregada para enumeração de *Listeria monocytogenes* nos produtos cárneos analisados está esquematizada na Figura 2.

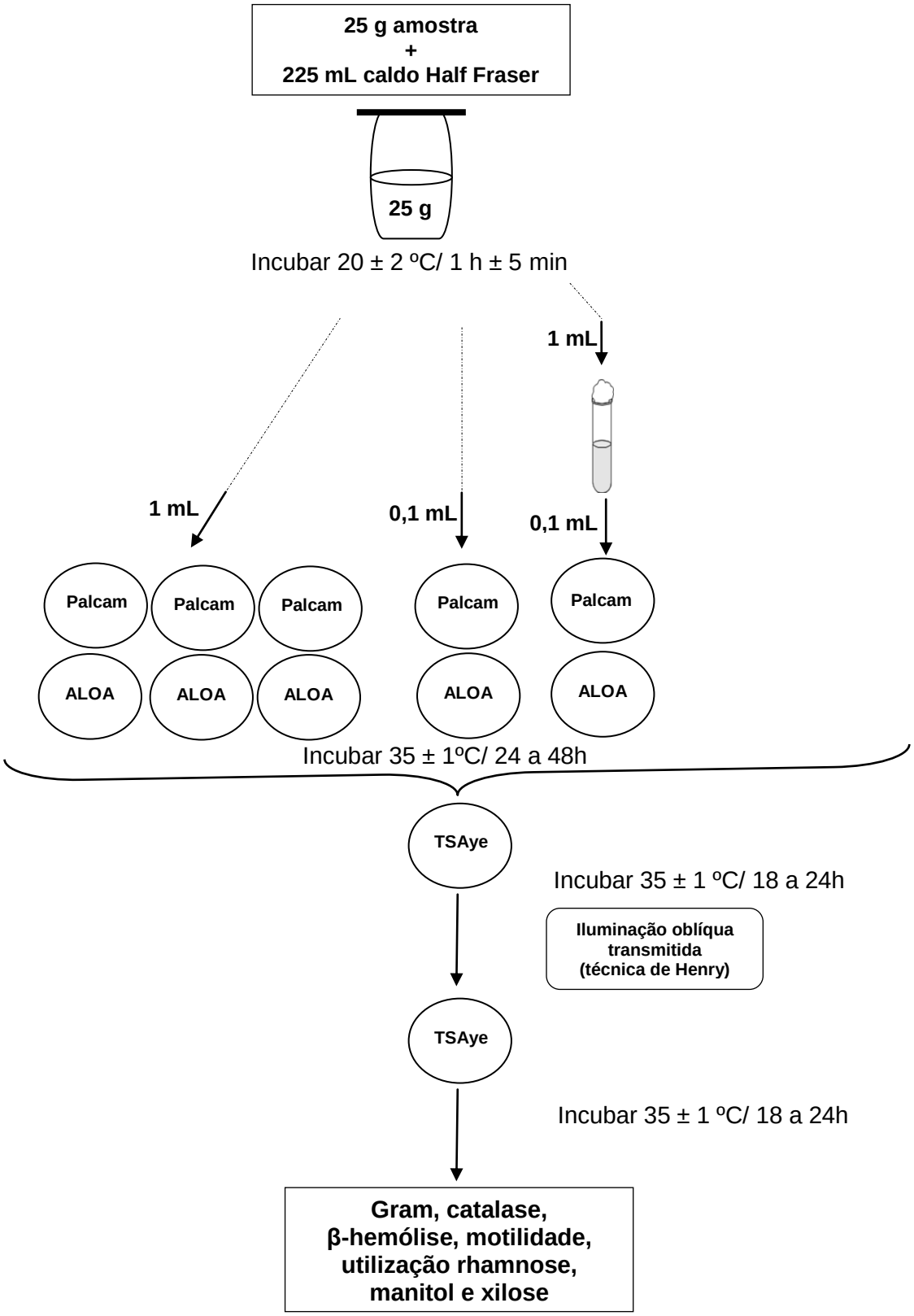

Figura 2 - Esquema da metodologia empregada para enumeração de *Listeria monocytogenes*.

3.2.5 Sorotipagem molecular de *Listeria monocytogenes*

A sorotipagem molecular foi realizada utilizando-se a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) multiplex para os genes *prs*, ORF2819, ORF2110, *lmo0737* e *lmo1118*, segundo metodologia descrita por Doumith et al. (2004), com modificações. As seqüências de nucleotídeos utilizados como *primers* para a reação estão descritos na Tabela 01.

Tabela 01 – *Primers* utilizados na sorotipagem de *Listeria monocytogenes* segundo Doumith et al. (2004).

Gene	**Seqüência de nucleotídeos (5´- 3´)**	**Especificidade para o sorotipo de *L. monocytogenes***	**Tamanho do fragmento (pb)**
lmo0737	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	1/2a, 1/2c, 3a e 3c	691
lmo1118	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTCGGCATACTTA	1/2c e 3c	906
ORF2819	F: AGCAAAATGCCAAAACTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e	471
ORF2110	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	4b, 4d e 4e	597
prs	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	Todas as espécies de *Listeria*	370

F: Forward
R: Reverse

A PCR foi realizada, preferencialmente, com dois isolados de cada amostra de produto cárneo positiva para *L. monocytogenes,* selecionados das placas de ágar Palcam e ALOA.

Extração do DNA genômico

Os isolados obtidos a partir dos produtos cárneos analisados e as cepas controle foram semeados em tubos com caldo tripticase de soja com 0,6% de extrato de levedura (TSBye) e incubados a 35 °C por 18-24 h. Alíquotas de 1 mL do caldo foram submetidas à centrifugação (14.000 xg) por dois minutos em centrífuga Mikro 120 (Hettich, Alemanha). O DNA das células foi extraído utilizando-se o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Amplificação do DNA extraído

Foram utilizadas cepas padrão como controles positivo e negativo (Tabela 2). Empregou-se, também, um controle negativo da reação de PCR, constituído de água destilada ultra pura livre de DNase/RNases (Invitrogen, EUA).

Tabela 02 – Cepas padrão utilizadas como controle positivo e negativo, segundo sorotipo e genes.

Cepas	Sorotipos	Genes
L. monocytogenes ATCC 19111	1/2a	*lmo0737, prs*
L. monocytogenes ATCC 19113	3a	*lmo0737, prs*
L. monocytogenes ATCC 19114	4a	*prs*
L. monocytogenes ATCC 19115	4b	ORF2819, ORF2110, *prs*
L. monocytogenes ATCC 7644	1/2c	*lmo1118, lmo0737, prs*
L. monocytogenes IAL 1981	4c	*prs*
L. monocytogenes IAL 633	1/2a	*lmo0737, prs*
L. ivanovii IAL 1983	-	*prs*

A PCR multiplex foi realizada a partir de uma solução contendo 2 μL do DNA teste (preparado como descrito anteriormente), 12,5 μL de GoTaq® Green Master Mix [200 μM de cada dNTP e 1,5 mM $MgCl_2$ (pH 8,5)] (Promega, EUA), adicionando-se os 5 pares de *primers* (IDT, Integrated DNA Technologies, EUA) nas concentrações de 5 pmoles para *Imo*0737, *ORF2819* e *ORF2110*, 7,5 pmoles para *Imo1118* e 2,5 pmoles para *prs* e água ultra pura livre de DNase/ RNases (Invitrogen, EUA) para um volume final de reação de 25 μL. A amplificação foi realizada através de aquecimento inicial a 94 °C por 3 min. seguida de 35 ciclos de 40 seg. a 94 °C; 1.15 min. a 55 °C e 1.15 min. a 72° C e uma extensão final a 72 °C por 7 min. em Termociclador Endurance TC-412 (Techne, EUA). Os produtos amplificados foram armazenados a 4 °C até o momento do uso.

A detecção dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose (Invitrogen, EUA) a 1,3% em tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de-EDTA [pH 8.0]), contendo brometo de etídio a 0,5 μg/mL. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 bp (Promega, EUA). O gel foi submetido à eletroforese (fonte PS 1006, Apelex, França) em cuba horizontal contendo tampão TBE 1x, durante 10 minutos a 60 V e 60 minutos a 150 V. Após a corrida, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV), com o auxílio do sistema de fotodocumentação Gel Logic 200 (Apelex, França) acoplado a um computador.

Quando necessário, os genes amplificados na PCR multiplex foram confirmados individualmente por PCR, utilizando apenas um par de *primer* em cada reação.

3.2.6 Detecção de *Salmonella* spp.

Para detecção de *Salmonella* spp. nas amostras de produtos cárneos foi utilizada a metodologia descrita no *International Organization for Standardization* (ISO 6579:2002) com modificações. Uma alíquota de 25 g de cada amostra foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada tamponada 1% (APT) em *stomacher* por 60 segundos, seguido de incubação a 37 ± 1 ºC por 18 ± 2 h.

Após esse período, transferiu-se 1 mL de cada homogeneizado para tubos contendo 10 mL de caldo Tetrationato Muller-Kauffmann com novobiocina (MKTTn) e 0,1 mL para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis com soja (RVS). Os tubos foram incubados por 24 ± 3 h a 37 ± 1 ºC e 41,5 ± 1 ºC, respectivamente. Alíquotas de cada tubo foram estriadas, por esgotamento, em dois meios seletivos diferenciais: ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e ágar *Salmonella-Shigella* (SS), seguido de incubação a 37 ± 1 ºC por 24 ± 3 h.

As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram isoladas em meio IAL, presuntivo para identificação de enterobactérias (PESSOA; SILVA, 1974), e incubadas a 37 ± 1 ºC por 24 ± 3 h. Os isolados com respostas bioquímicas características de *Salmonella* foram repicados em ágar nutriente, seguido de incubação a 37 ± 1 ºC por 24 ± 3 h, para serem submetidos à sorologia com anti-soros polivalentes (flagelar e somático).

As cepas que apresentaram sorologia positiva para *Salmonella* foram enviadas ao Setor de Enterobactérias da Seção Bacteriologia, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, para serem submetidas à sorotipagem completa de acordo com POPOFF; LE MINOR, 2005.

Os resultados foram expressos como ausência ou presença de *Salmonella* spp. em 25 g do produto cárneo.

A metodologia empregada para pesquisa de *Salmonella* spp. nos produtos cárneos analisados está esquematizada na Figura 3.

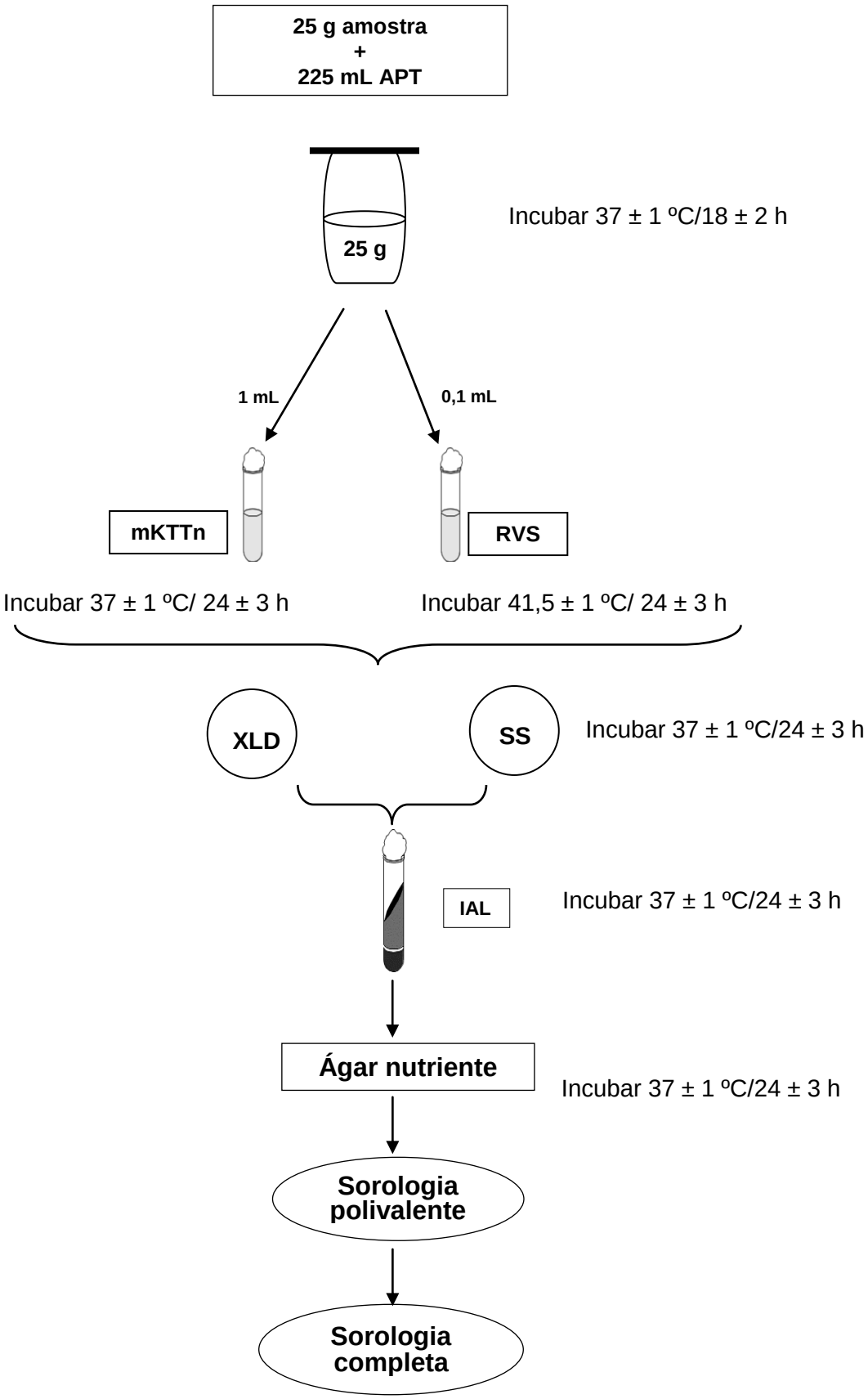

Figura 3 - Esquema da metodologia empregada para detecção de *Salmonella* spp.

3.2.7 Enumeração de *Salmonella* spp.

Para enumeração de *Salmonella* spp. nas amostras de produtos cárneos foi empregada a técnica do Número Mais Provável (NMP) (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001) e ISO 6579:2002 com modificações, utilizando-se o homogeneizado (diluição 10^{-1}) preparado para detecção de *Salmonella* spp. (item 3.2.6). A diluição 10^{-2} foi preparada homogeneizando-se 1 mL da diluição 10^{-1} em 9 mL de APT.

Três alíquotas de 10 mL da diluição 10^{-1} foram transferidas para tubos contendo 10 mL de APT concentração dupla. Outras três alíquotas de 1 mL da diluição 10^{-1} foram transferidas para três tubos contendo 10 mL de APT concentração simples e três alíquotas de 1 mL da diluição 10^{-2} foram transferidas para três tubos contendo 10 mL de APT concentração simples. Todos os tubos foram incubados a 37 ± 1 ºC por 18 ± 2 h.

Após a incubação, transferiu-se 1 mL de cada tubo de APT para tubos contendo 10 mL de MKTTn e 0,1 mL para tubos com 10 mL de RVS, seguido de incubação por 24 ± 3 h a 37 ± 1 ºC e 41,5 ± 1 ºC, respectivamente. Em seguida, alíquotas de cada tubo foram estriadas, por esgotamento, em dois meios seletivos diferenciais: ágar XLD e ágar SS, seguido de incubação a 37 ± 1 ºC por 24 ± 3 h.

As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram submetidas aos testes de identificação descritos em 3.2.6. Com base no número de tubos positivos para *Salmonella* spp., calculou-se a quantidade deste microrganismo na amostra utilizando-se a tabela de Hoskins. Os resultados foram expressos como NMP por grama do produto cárneo.

A metodologia empregada para enumeração de *Salmonella* spp. nos produtos cárneos analisados está esquematizada na Figura 4.

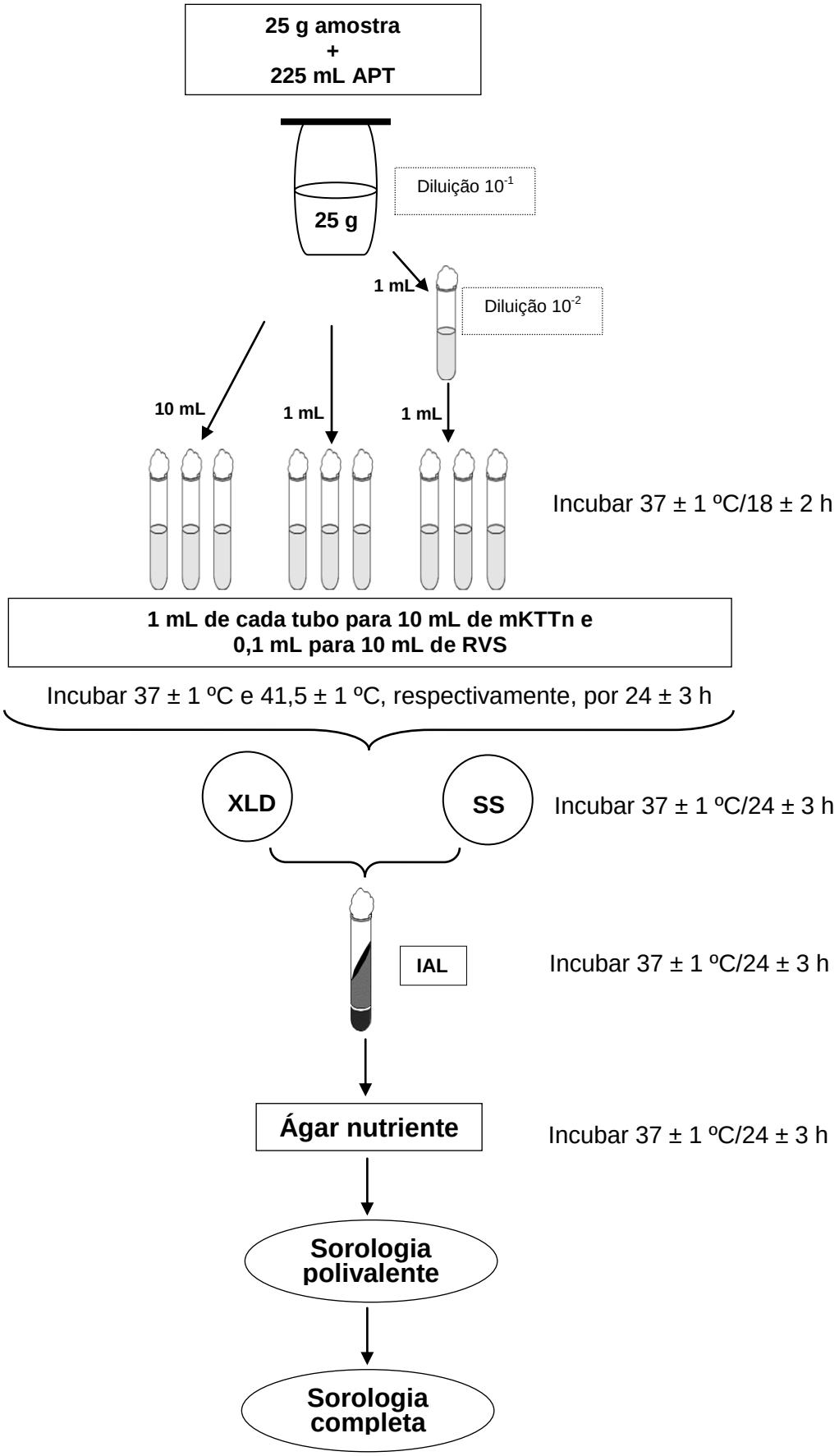

Figura 4 - Esquema da metodologia empregada para enumeração de *Salmonella* spp.

3.2.8 Detecção de *Campylobacter* spp.

Para pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras de produtos cárneos foi utilizada a metodologia descrita no *International Organization for Standardization* (ISO 10272-1:2006). Uma alíquota de 25 g de cada amostra foi homogeneizada com 225 mL de caldo Bolton em *stomacher* por 60 segundos, seguido de incubação a 37 ± 1 ºC em microaerofilia (5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2) (Difco, EUA) por 4 h e, em seguida, a 41,5 ± 1 ºC por 44 ± 4 h, também em microaerofilia.

Os caldos foram estriados em placas contendo ágar carvão desoxicolato cefoperazone modificado (mCCDA) e ágar Skirrow e as placas incubadas a 41,5 ± 1 ºC por 44 ± 4 h, em microaerofilia. Três a cinco colônias suspeitas de *Campylobacter* spp. foram transferidas para placas de Petri contendo ágar Columbia, seguido de incubação a 41,5 ± 1 ºC por 24 a 48 h, em microaerofilia.

As colônias foram submetidas à coloração com cristal violeta e às provas de catalase, oxidase, crescimento a 25 ºC e 41,5 ºC, resistência ao ácido nalidíxico e cefalotina, hidrólise do hipurato e do acetato. Os resultados foram expressos como ausência ou presença de *Campylobacter* spp. em 25 g do produto cárneo.

A metodologia utilizada para detecção de *Campylobacter* spp. nos produtos cárneos analisados está esquematizada na Figura 5.

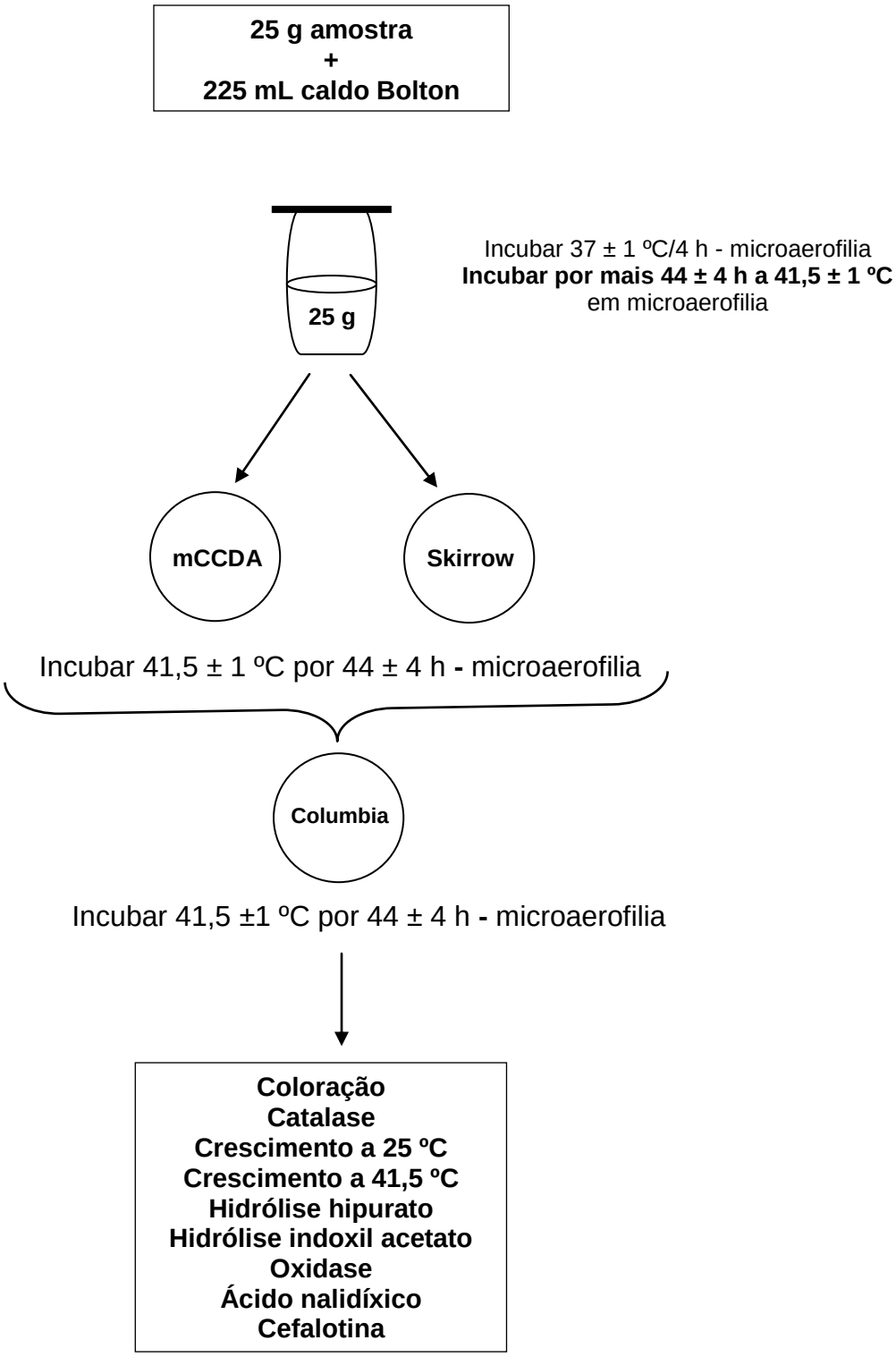

Figura 5 - Esquema da metodologia empregada para detecção de *Campylobacter* spp.

3.2.9 Detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC)

A metodologia utilizada para detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) nas amostras de produtos cárneos foi a descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods,* 2001 (MENG; FENG; DOYLE, 2001). Uma alíquota de 25 g de cada amostra foi homogeneizada com 225 mL de caldo EC modificado (Difco, EUA) adicionado de novobiocina (Sigma, EUA) em *stomacher* por 60 segundos, seguido de incubação a 35 ± 1 ºC por 18 a 24 h.

O caldo foi estriado em placas de Petri contendo ágar MacConkey sorbitol (SMAC) e ágar MacConkey sorbitol com cefixima e telurito (SMAC-CT). Após a incubação das placas a 35 ± 1 ºC por 18 a 24 h, cinco a dez colônias, sorbitol positivas e negativas, foram selecionadas e transferidas com auxílio de agulha de níquel cromo para o meio IAL e incubadas a 35 ± 1 ºC por 18 a 24 h. As colônias suspeitas de *E. coli* foram isoladas em ágar TSAye, incubadas a 35 ± 1 ºC por 18 a 24 h, e submetidas aos testes de fermentação de lactose, citrato de Simmons e provas de Voges Proskauer e vermelho de metila. As cepas confirmadas como *E. coli* foram submetidas a técnica de PCR para pesquisa dos genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* e *hly*.

A pesquisa dos genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* e *hly* foi realizada utilizando-se a técnica de PCR multiplex segundo metodologia descrita por Paton e Paton (1998b), com modificações. Os *primers* utilizados para a reação estão descritos na Tabela 03.

Tabela 03 – *Primers* utilizados para a detecção dos genes stx_1, stx_2, *eae*A e *hly* por PCR multiplex segundo Paton e Paton (1998b).

Gene	**Seqüência de nucleotídeos (5´- 3´)**	**Tamanho do fragmento (pb)**
stx_1	F: ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R: AGAACGCCCACTGAGATCATC	180
stx_2	F: GGCACTGTCTGAAACTGCTCC R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255
*eae*A	F: GACCCGGCACAAGCATAAGC R: CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384
hly	F: GCATCATCAAGCGTACGTTCC R: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534

F: Forward
R: Reverse

Extração do DNA genômico

Os isolados obtidos a partir dos produtos cárneos analisados e as cepas controle (*E. coli* O157:H7 IAL 1848 e *E. coli* K1) foram semeados em caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubados a 35 °C por 18-24 h. Alíquotas de 1 mL do caldo foram submetidas à centrifugação (14.000 xg) por dois minutos em centrífuga Mikro 120 (Hettich, Alemanha). O DNA das células foi extraído utilizando-se o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Amplificação do DNA extraído

Além das cepas utilizadas como controle positivo (*E. coli* O157:H7 IAL 1848) e negativo (*E. coli* K1), empregou-se, também, um controle negativo da reação de PCR, constituído de água destilada ultra pura livre de DNase/RNases (Invitrogen, EUA).

A PCR multiplex foi realizada a partir de uma solução contendo 2 μL do DNA teste (preparado como descrito anteriormente), 12,5 μL de GoTaq® Green Master Mix [200 μM de cada dNTP e 1,5 mM $MgCl_2$ (pH 8,5)] (Promega, EUA), adicionando-se os 4 pares de *primers* (IDT, Integrated DNA Technologies, EUA) nas concentrações de 10 pmoles e água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen, EUA) para um volume final de reação de 25 μL. A amplificação foi realizada através de aquecimento inicial a 95 °C por 5 min seguido de 35 ciclos de 45 seg a 95 °C; 45 seg a 56 °C e 1 min a 72 °C e uma extensão final por 5 min a 72 °C em Termociclador Endurance TC-412 (Techne, EUA). Os produtos amplificados foram armazenados a 4 °C até o momento do uso.

A detecção dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose (Invitrogen, EUA) a 1,0% em tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de-EDTA [pH 8.0]), contendo brometo de etídio a 0,5 μg/mL. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 bp (Promega, EUA). O gel foi submetido à eletroforese (fonte PS 1006, Apelex, França) em cuba horizontal contendo tampão TBE 1x, durante 10 minutos a 60 V e 60 minutos a 100 V. Após a corrida o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV), com o auxílio do sistema de fotodocumentação Gel Logic 200 (Apelex, França) acoplado a um computador.

A metodologia empregada para detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) nos produtos cárneos analisados está esquematizada na Figura 6.

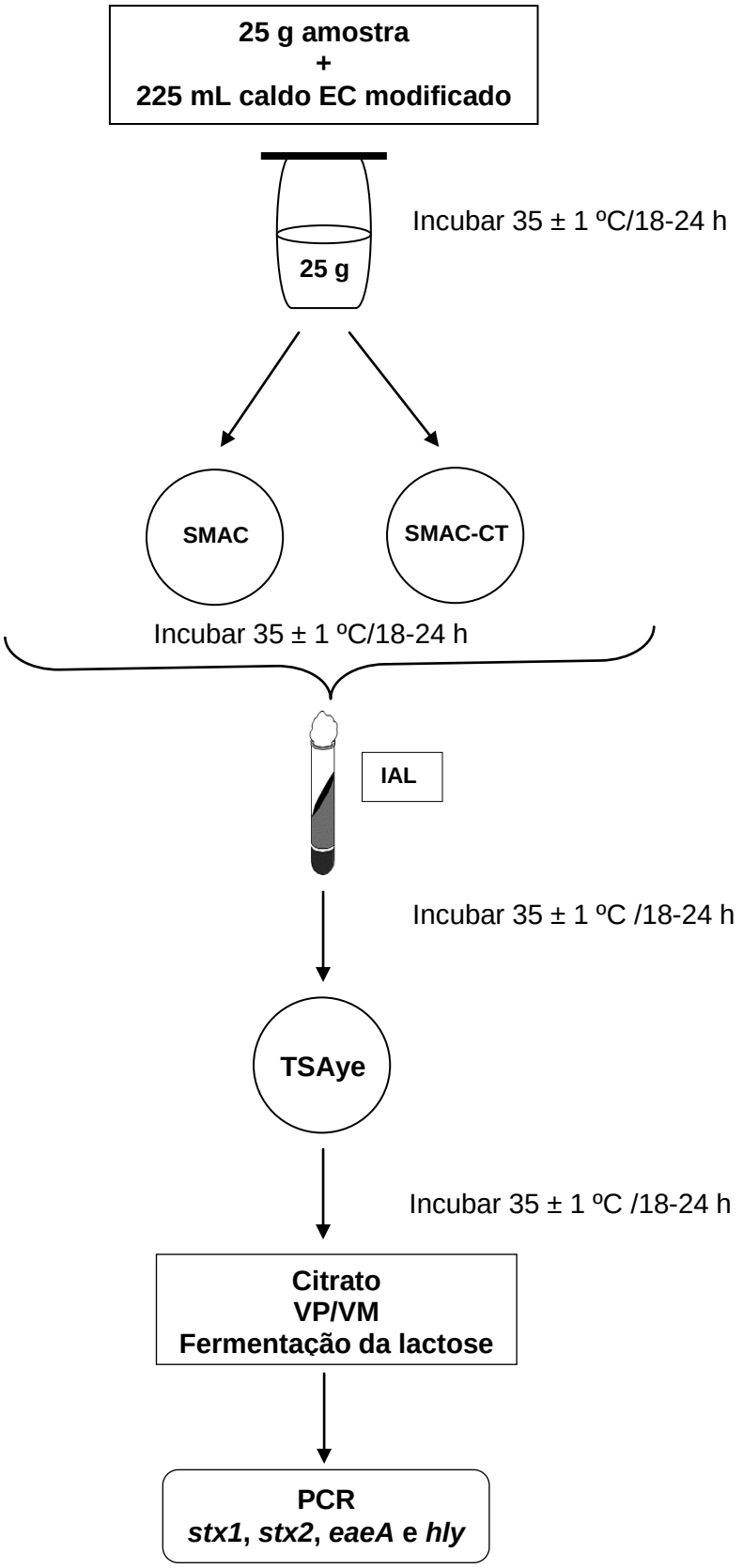

Figura 6 - Esquema da metodologia empregada para detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC).

3.2.10 Enumeração de coliformes termotolerantes

A enumeração de coliformes termotolerantes nas amostras de produtos cárneos foi feita pela técnica do NMP, conforme Kornacki e Johnson (2001). Uma porção de 25 g de cada amostra foi homogeneizada com 225 mL de APT em *stomacher* por 60 segundos (diluição 10^{-1}) e submetida à diluições decimais seriadas até 10^{-3}, em APT. Um mL de cada uma das diluições foi transferido para três séries de tubos, contendo caldo lauril sulfato triptose e um tubo de Durhan, seguido de incubação a 35 ± 1 ºC por 48 ± 3 h.

Os caldos que apresentaram turvação e gás nos tubos de Durhan foram transferidos para tubos contendo o caldo *Escherichia coli* (EC), seguido de incubação a 45 ± 0,5 ºC por 48 ± 3 h.

Novamente, os tubos que apresentavam turvação e gás nos tubos de Durhan foram considerados positivos. De acordo com o número de tubos positivos para cada diluição testada, determinou-se o NMP de coliformes termotolerantes por grama de produto cárneo, empregando-se a tabela de Hoskins.

3.2.11 Análise Estatística

Para avaliar a associação dos resultados positivos para os patógenos estudados com a região de coleta das amostras utilizou-se o teste do Qui-quadrado, conforme Siegel (1975). O mesmo teste foi realizado para verificar a correlação da contagem de microrganismos indicadores (coliformes termotolerantes) com a presença dos patógenos nas amostras estudadas. Adotou-se um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

Do total de amostras de produtos cárneos analisados, *Listeria monocytogenes* foi o patógeno isolado com maior freqüência, sendo detectado em 48,7% das amostras, seguido por *Campylobacter* spp. em 6,0% e *Salmonella* spp. em 5,8%. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) não foi detectada em nenhuma das amostras estudadas. Os resultados da ocorrência dessas bactérias de acordo com o produto cárneo analisado estão representados na Tabela 04 e na Figura 07.

Tabela 04 – Ocorrência de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) nos produtos cárneos analisados.

	NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS									
	Salsicha (N=138)		**Lingüiça** (N=138)		**Carne moída** (N=138)		**Coxa de frango** (N=138)		**Total** (N=552)	
	n	**(%)**	**n**	**(%)**	**n**	**(%)**	**n**	**(%)**	**n**	**(%)**
L. monocytogenes	52	(37,7)	55	(39,8)	82	(59,4)	80	(58,0)	**269**	**(48,7)**
***Salmonella* spp.**	0	(0)	20	(14,5)	0	(0)	12	(8,7)	**32**	**(5,8)**
***Campylobacter* spp.**	0	(0)	0	(0)	6	(4,3)	27	(19,6)	**33**	**(6,0)**
***E. coli* (STEC)**	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	**0**	**(0)**

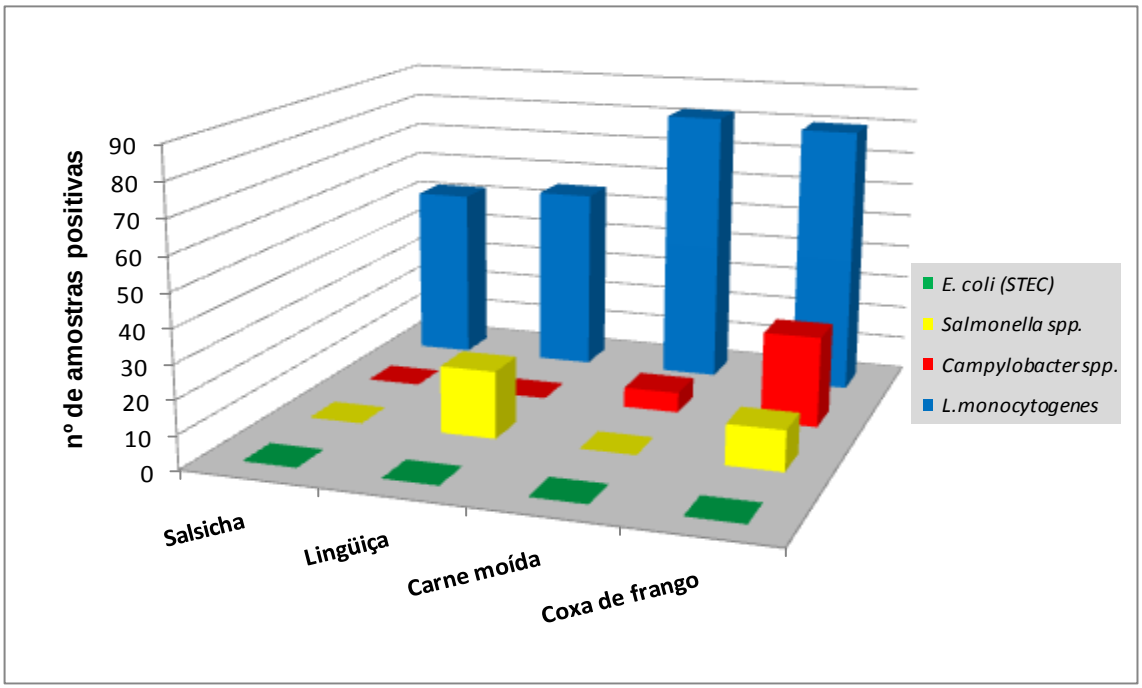

Figura 07 – Positividade de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* (STEC) nos diferentes tipos de produtos cárneos analisados.

Com relação à região de coleta, foi observado que o número de amostras positivas para pelo menos um dos patógenos estudados foi mais alto na região leste (35,9%). Prevalências mais baixas foram encontradas nas amostras procedentes das regiões sul (23,5%), norte (20,3%), oeste (11,8%) e central (8,5%) (Figura 08). Entretanto, não foi observada associação entre a positividade dos patógenos isolados e as regiões estudadas ($p>0,05$).

Considerando por cada categoria de produto cárneo, a prevalência de *L. monocytogenes* nas amostras de carne moída obtidas na região norte (>70%) foi significativamente superior ($p<0,05$) às encontradas nas demais regiões. Para os outros produtos analisados, esta diferença não foi observada ($p>0,05$).

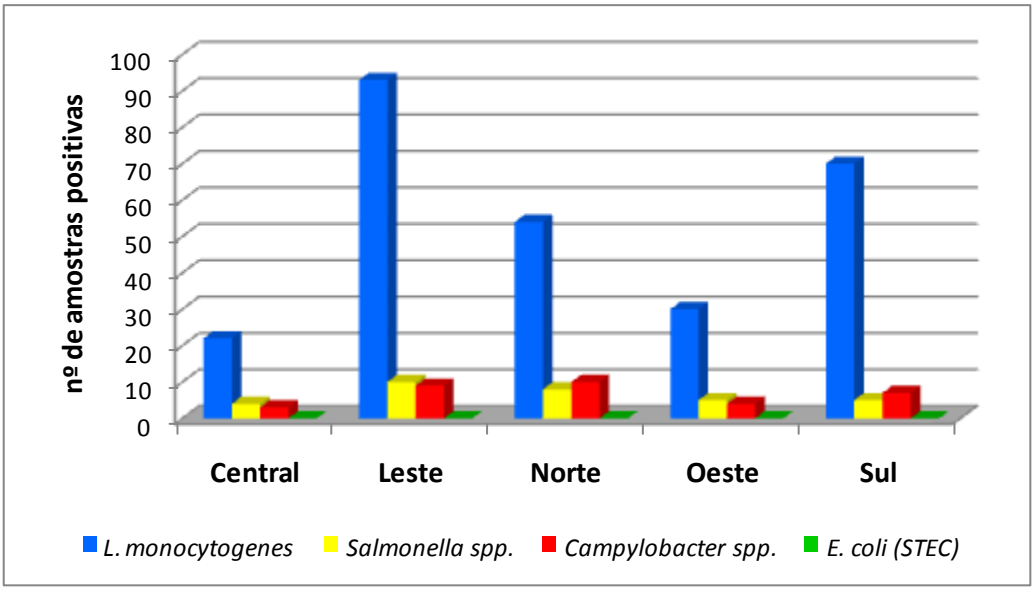

Figura 08 - Distribuição da positividade de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* (STEC) nos produtos cárneos analisados, de acordo com a região de coleta no município de São Paulo.

4.1 *Listeria monocytogenes*

Entre as bactérias avaliadas no presente estudo, *Listeria* spp. foi a mais freqüente, detectada em 468 (84,8%) dos produtos cárneos estudados. A espécie isolada com maior freqüência foi *Listeria innocua* (63,9%), seguida de *Listeria monocytogenes* (48,7%), *Listeria welshimeri* (13,6%) e *Listeria seeligeri* (6,3%). *Listeria grayi* subespécie *murrayi* foi detectada em apenas uma amostra de salsicha (0,2%) (Tabela 05).

Além da elevada prevalência, *L. monocytogenes* foi detectada em todos os tipos de produtos cárneos estudados, com freqüências mais elevadas nas amostras de carne moída (59,4%), seguido de coxa de frango (58,0%), lingüiça (39,8%) e salsicha (37,7%).

Tabela 05 - Distribuição das espécies de *Listeria* nos produtos cárneos estudados.

	Nº amostras positivas				
	Salsicha	**Lingüiça**	**Carne moída**	**Coxa de frango**	**Total (%)**
L. monocytogenes	52	55	82	80	**269 (48,7)**
L. innocua	64	75	114	100	**353 (63,9)**
L. welshimeri	8	36	9	22	**75 (13,6)**
L. seeligeri	10	9	10	6	**35 (6,3)**
L. gray murrayi	1	0	0	0	**1 (0,2)**

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada por duas metodologias, a de detecção (presença/ausência em 25 g) e a de enumeração (UFC/g). A maior freqüência de isolamento foi observada pela metodologia de detecção (Tabela 06). Entretanto, em 25 amostras de carne moída, cinco de coxa de frango, três de lingüiça e duas de salsicha positivas para *L. monocytogenes*, a presença da bactéria foi detectada somente pelo método de contagem, não sendo detectada pela pesquisa em 25 g do produto.

Tabela 06 – Positividade para *L. monocytogenes* nos produtos cárneos estudados, de acordo com o método de análise utilizado (detecção ou enumeração).

	Método de detecção (25g)		**Método de enumeração (UFC/g)**	
	n	**%**	**n**	**%**
Salsicha	50	36,2	9	6,5
Lingüiça	52	37,6	11	8,0
Carne moída	57	41,3	56	40,6
Coxa de frango	75	54,3	19	13,8
Total	**234**	**42,4**	**95**	**17,2**

Os resultados observados pelo método de enumeração de *L. monocytogenes* mostraram que na maioria das amostras (67,4%) nas quais a contagem do patógeno foi possível, as contagens foram inferiores a 10^2 UFC/g (Tabela 07). Nas amostras de salsicha, os valores variaram de < 10 a $1,9x10^2$ UFC/g, em lingüiça de < 10 a $5,6x10^2$ UFC/g, em coxa de frango de < 10 a $8,9x10^2$ UFC/g e em carne moída de < 10 a $4,5x10^3$ UFC/g.

Tabela 07 – Distribuição das amostras de produtos cárneos estudados de acordo com a contagem de *L. monocytogenes*.

	Contagens de *L. monocytogenes* (UFC/g)			
	<10	**10 a 10^2**	**>10^2 a ≤ 10^3**	**>10^3**
Salsicha	129	7	2	0
Lingüiça	127	9	2	0
Carne moída	82	34	17	5
Coxa de frango	119	14	5	0
Total	**457 (82,8%)**	**64 (11,6)**	**26 (4,7)**	**5 (0,9)**

4.1.1. Sorotipagem molecular de *L. monocytogenes*

Das 775 cepas de *L. monocytogenes* isoladas dos produtos cárneos estudados, 442 foram submetidas à sorotipagem molecular, sendo 143 cepas provenientes de 95 amostras de carne moída, 134 cepas provenientes de 93 amostras de coxa de frango, 83 cepas provenientes de 59 amostras de lingüiça e 82 cepas provenientes de 55 amostras salsicha.

Os perfis obtidos foram comparados com os perfis padrões de sorotipagem dos produtos de amplificação apresentados na Figura 09. Segundo Doumith et al. (2004), a PCR multiplex permite separar as cepas de *L. monocytogenes* em quatro grupos sorológicos: o Grupo 1 contém os sorotipos 1/2a e 3a (fragmento *lmo0737*, de 691 pb), o Grupo 2 contém os sorotipos 1/2c e 3c (fragmentos *lmo0737* e *lmo1118*, 691 pb e 906 pb, respectivamente), o Grupo 3 contém os sorotipos 1/2b, 3b e 7 (fragmento ORF2819, 471 pb) e o Grupo 4 os sorotipos 4b, 4d e 4e (fragmentos ORF2819 e ORF2110, 471 pb e 597 pb, respectivamente). Os sorotipos 4a e 4c, assim como todas as demais espécies de *Listeria* amplificam o fragmento *prs* de 370 pb.

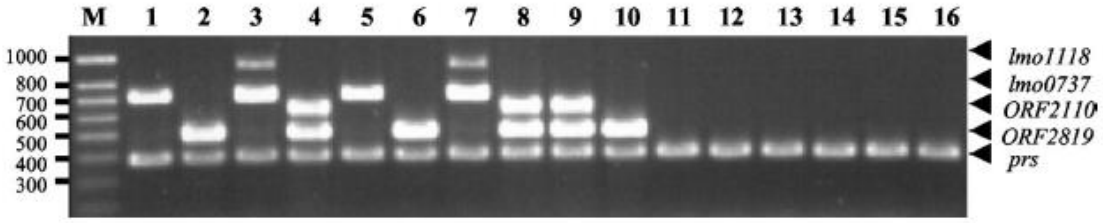

Foto: Doumith et al., 2004

Figura 09 - Eletroforese de gel de agarose com perfis de fragmentos de DNA gerados pela PCR multiplex para sorotipagem molecular de cepas *L. monocytogenes*. Nas linhas de 1 a 12 estão demonstrados os perfis das cepas de *L. monocytogenes* dos sorovares: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 3a, 3b, 3c, 4d, 4e, 7, 4a e 4c. Os controles negativos estão descritos das linhas 13 a 16 (*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, respectivamente). Na linha M está o peso de marcador molecular. No lado direito estão indicados os genes correspondentes ao fragmento amplificado (Doumith et al., 2004).

Dentre as cepas analisadas por PCR multiplex, 28,7% das cepas foram identificadas como pertencentes ao Grupo 1 que compreende os sorotipos 1/2a e 3a, 21,0% ao Grupo 2 que contém os sorotipos 1/2c e 3c, 17,0 % ao Grupo 3 que contém os sorotipos 1/2b, 3b e 7 e 13,8% ao Grupo 4 que compreende os sorotipos 4b, 4d e 4e. Em três cepas (0,7%) ocorreu amplificação somente do gene *prs*, o que indica que estas cepas podem ser pertencentes ao sorotipo 4a, 4c ou mesmo não serem *L. monocytogenes*, já que esse gene está presente em todos os gêneros de *Listeria* (Tabela 08).

Em 83 (18,8%) cepas foi detectado um perfil atípico (não tipável), com amplificação de quatro fragmentos de DNA de 370 pb, 471 pb, 597 pb e 691 pb, sendo os três primeiros característicos do Grupo 4 e o último do Grupo 1. A presença destes quatro fragmentos de DNA detectados pela técnica de PCR multiplex foi confirmada também pela técnica de PCR.

Tabela 08 – Distribuição dos perfis de sorotipagem molecular das cepas de *L. monocytogenes* isoladas.

	Perfis de sorotipagem						
	Grupo 1 (1/2a e 3a)	**Grupo 2** (1/2c e 3c)	**Grupo 3** (1/2b, 3b e 7)	**Grupo 4** (4b, 4d e 4e)	**4a ou 4c**	**Não tipável**	**TOTAL**
Salsicha	19	8	32	15	0	8	**82**
Lingüiça	41	18	11	10	1	2	**83**
Carne moída	7	38	22	22	1	53	**143**
Coxa de frango	60	29	10	14	1	20	**134**
TOTAL	**127**	**93**	**75**	**61**	**3**	**83**	**442**

Em relação aos perfis de sorotipagem detectados nos diferentes tipos de produtos cárneos analisados (Tabela 09 e Figura 10), verificou-se que nas amostras de lingüiça e coxa de frango houve prevalência do Grupo 1 (45,8% e 41,9%, respectivamente). Nas amostras de salsicha houve prevalência do Grupo 3 (41,8%). Nas amostras de carne moída, não houve prevalência de nenhum dos perfis de sorotipagem descritos na metodologia de PCR multiplex utilizada (Doumith et al., 2004), verificando-se que em 33,7% das amostras foi encontrado um perfil atípico. Em 34 (7,7%) amostras, houve o isolamento concomitantemente de dois tipos de perfil molecular.

Tabela 09 – Distribuição dos perfis de sorotipagem molecular das cepas de *L. monocytogenes* sorotipadas, de acordo com o tipo de produto cárneo analisado.

	Perfis de sorotipagem													
	Grupo 1 (1/2a e 3a)		**Grupo 2** (1/2c e 3c)		**Grupo 3** (1/2b, 3b e 7)		**Grupo 4** (4b, 4d e 4e)		**4a ou 4c**		**Não tipável**		**TOTAL**	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Salsicha	14	25,4	5	9,1	23	41,8	9	16,4	0	0	4	7,3	**55**	**18,2**
Lingüiça	27	45,8	13	22	9	15,2	8	13,5	1	1,7	1	1,7	**59**	**19,5**
Carne moída	5	5,3	28	29,5	15	15,8	14	14,7	1	1,0	32	33,7	**95**	**31,4**
Coxa de frango	39	41,9	20	21,5	8	8,6	9	9,7	1	1,1	16	17,2	**93**	**30,8**

Em destaque os perfis moleculares mais freqüentes em cada tipo de produto cárneo analisado.

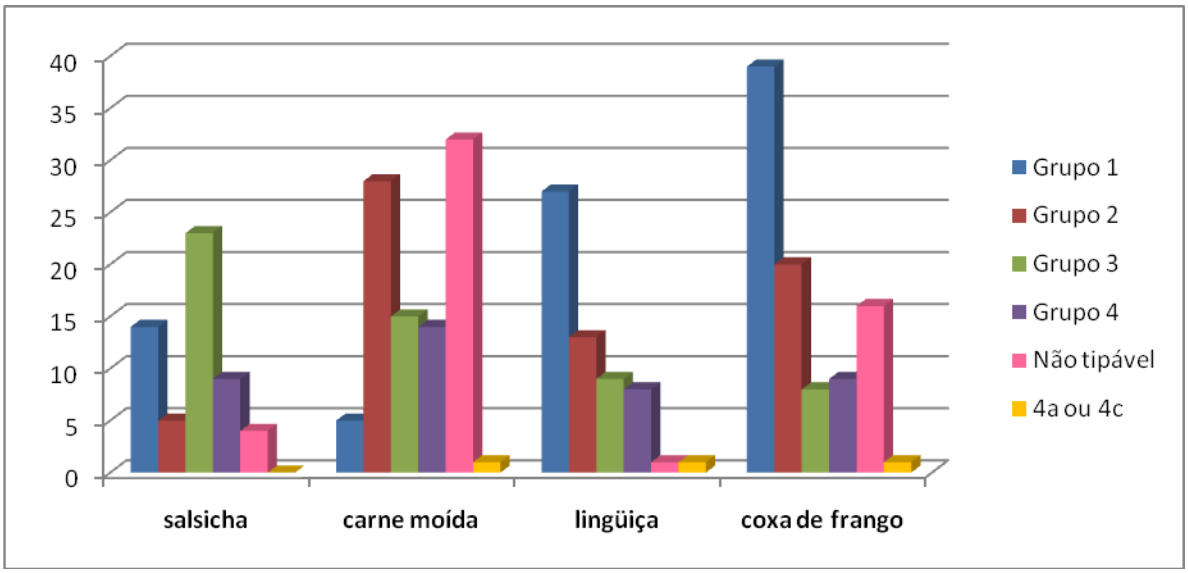

Figura 10 - Distribuição dos perfis de sorotipagem molecular das cepas de *L. monocytogenes* sorotipadas, de acordo com o tipo de produto cárneo analisado.

Os resultados típicos encontrados para a PCR multiplex dos genes *prs*, ORF2819, ORF2110, *lmo0737* e *lmo1118* podem ser observados nas Figuras 11 e 12.

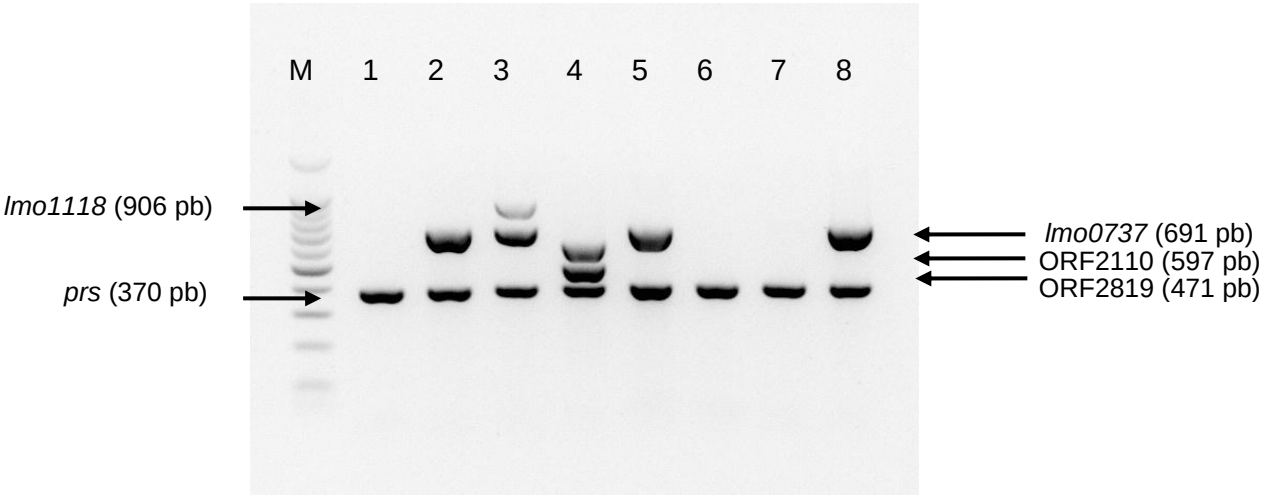

Figura 11 - Perfil molecular de sorotipagem de *L. monocytogenes* das amostras de controle. M: marcador de peso molecular (100 pb). 1: *L. ivanovii*; 2: *L. monocytogenes* ATCC 19111 (1/2a); 3: *L. monocytogenes* ATCC 7644 (1/2c); 4: *L. monocytogenes* ATCC 19115 (4b); 5: *L. monocytogenes* ATCC 19113 (3a); 6: *L. monocytogenes* ATCC 19114 (4a); 7: *L. monocytogenes* IAL 1981 (4c); 8: *L. monocytogenes* IAL 633 (1/2a).

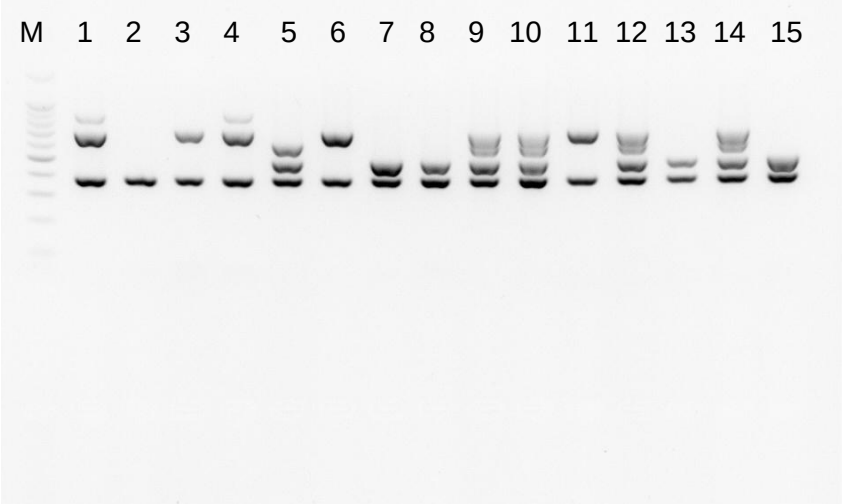

Figura 12 - Perfil molecular de sorotipagem de *L. monocytogenes* de algumas cepas isoladas dos produtos cárneos analisados. M: marcador de peso molecular (100 pb). 1: Grupo 2 (1/2c e 3c); 2: 4a ou 4c; 3: Grupo 1 (1/2a e 3a); 4: Grupo 2 (1/2c e 3c); 5: Grupo 4 (4b, 4d e 4e); 6: Grupo 1 (1/2a e 3a); 7 e 8 Grupo 3 (1/2b, 3b e 7); 9 e 10: não tipável; 11: Grupo 1 (1/2a e 3a); 12: não tipável; 13: Grupo 3 (1/2b, 3b e 7); 14: não tipável; 15: Grupo 3 (1/2b, 3b e 7).

4.2 *Salmonella* spp.

Dentre as 552 amostras de produtos cárneos analisadas, 32 apresentaram resultados positivos para *Salmonella* spp., sendo 20 (14,5%) de lingüiça e 12 (8,7%) de coxa de frango. Nenhuma das amostras de salsicha e carne moída foi positiva para *Salmonella* spp.

Com relação à população de *Salmonella* spp, as amostras positivas pelo método de enumeração apresentaram contagens baixas, que variaram de 3,0 a 9,3x10 NMP/g. Quatro amostras (três de lingüiça e uma de frango) em que foi possível fazer a enumeração de *Salmonella* spp. foram negativas quando testadas pelo método de detecção .

Dentre as amostras positivas foram isolados 14 sorovares: *S.* Typhimurium (28,1%), *S.* Enteritidis (12,5%), *S.* Derby (12,5%), *S.* I 4,[5],12:i:- (12,5%), *S.* Brandenburg (9,4%), *S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:c: z35 (6,2%), *S.* Infantis (6,2%), S. Anatum (3,1%), *S.* Newport (3,1%), *S.* Ohio (3,1%), *S.* Rissen (3,1%), *S.* Schwarzengrund (3,1%), *S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:c:- (3,1%) e *S.* I 4,[5],12:-:- (3,1%).

Nas Tabelas 10 e 11 estão representados os resultados da detecção e enumeração de *Salmonella* spp. nas amostras de lingüiça e coxa de frango, respectivamente.

Tabela 10 – Positividade de *Salmonella* spp. nas amostras de lingüiça estudadas, de acordo com o método de análise utilizado (detecção ou enumeração).

Nº	**Sorovar**	**Método de detecção (presença em 25 g)**	**Método de enumeração (NMP/g)**
1	*S.* Typhimurium	+	<0,3
2	*S.* Derby	+	9,3x10
3	*S.* Infantis	+	7,2x10
4	*S.* Infantis	-	3,0
5	*S.* Typhimurium	+	7,5x10
6	*S.* Typhimurium	+	<0,3
7	*S.* Brandenburg	+	<0,3
8	*S.* Typhimurium	+	<0,3
9	*S.* Rissen	+	<0,3
10	*S.* Typhimurium	+	<0,3
11	*S.* Typhimurium	+	9,1
12	*S.* I 4,[5],12:i:-	+	<0,3
13	*****S.* I 4,[5],12:-:- *****S.* Ohio	- +	0,36 <0,3
14	*S.* Typhimurium	+	<0,3
15	*S.* Derby	+	<0,3
16	*S.* Typhimurium	+	<0,3
17	**S.* I 4,[5],12:i:- **S.* Derby	+ -	<0,3 0,3
18	*S.* I 4,[5],12:i:-	+	<0,3
19	*S.* Derby	+	<0,3
20	*S.* Typhimurium	+	0,36

*** Cepas isoladas de uma mesma amostra**

Tabela 11 – Positividade de *Salmonella* spp. nas amostras de coxa de frango estudadas, de acordo com o método de análise utilizado (detecção ou enumeração).

Nº	Sorovar	Método de detecção (presença em 25 g)	Método de enumeração (NMP/g)
1	*S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:c:z35	+	<0,3
2	**S.* Anatum	+	<0,3
	**S.* Newport	+	<0,3
3	*S.* Brandenburg	+	<0,3
4	*S.* Brandenburg	+	0,36
5	*S.* Enteritidis	+	<0,3
6	*S.* Enteritidis	+	0,36
7	*S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:c:z35	+	<0,3
8	*S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:c:-	+	0,36
9	*S.* Schwarzengrund	+	<0,3
10	*S.* Enteritidis	+	<0,3
11	*S.* Enteritidis	-	0,91
12	*S.* I 4,[5],12:i:-	+	<0,3

***Cepas isoladas de uma mesma amostra**

4.3 *Campylobacter* spp.

Do total de 552 produtos cárneos analisados, *Campylobacter* spp. foi detectado em 33 amostras (6,0%), sendo 27 de coxa de frango (19,6%) e seis amostras de carne moída (4,3%). Nenhuma das amostras de salsicha e lingüiça foi positiva para *Campylobacter* spp.

Entre as amostras de coxa de frango positivas, em 14 (51,8%) detectou-se *Campylobacter coli*, em nove (33,3%) *Campylobacter jejuni* e em três (11,1%), ambas as espécies. Em uma das amostras, não foi possível a identificação da espécie, pois a colônia caracterizada morfologicamente, não foi recuperada para complementação das provas de identificação.

Quanto às amostras de carne moída positivas, todos os isolados foram caracterizados como *C. jejuni*.

4.4 *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC)

Dos 171 isolados de *Escherichia coli* submetidos à pesquisa dos genes stx_1, stx_2, *eaeA* e *hly*, apenas três (1,7%) foram positivas para algum desses quatro genes. Uma cepa, isolada de lingüiça, foi positiva para os genes *eaeA* e *hly*, e outras duas cepas, isoladas de coxa de frango, apresentaram somente o gene *eaeA*. Nenhuma das cepas foi positiva para os genes stx_1 e stx_2, indicando não serem pertencentes ao grupo das STEC.

Os resultados típicos encontrados para a PCR multiplex dos genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* e *hly* podem ser observados na Figura 13.

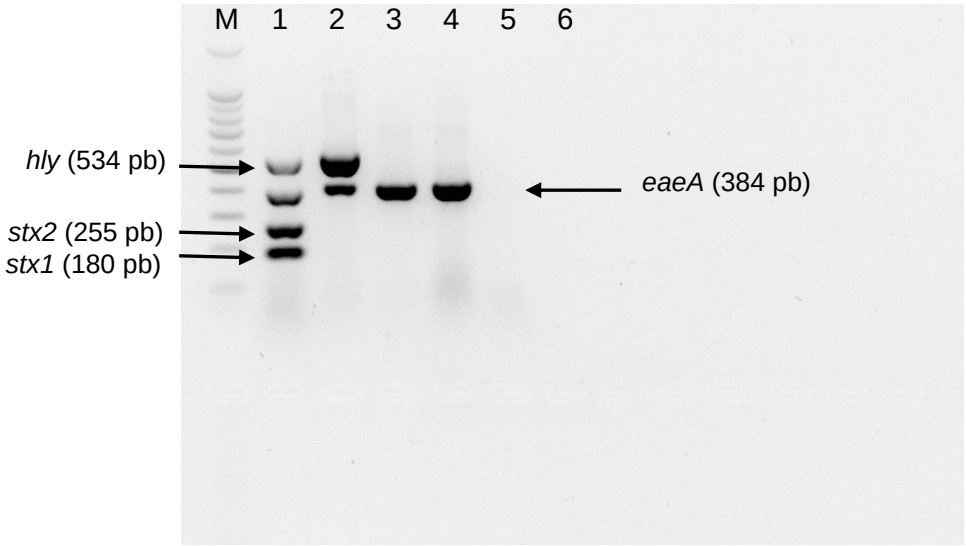

Figura 13 - Detecção dos genes stx_1, stx_2, *eaeA* e *hly* nas cepas de controle e dos isolados dos produtos cárneos. M: marcador de peso molecular (100 pb). 1: *E. coli* (C+); 2: amostra com genes *hly* e *eae*A; 3 e 4: amostra com gene *eae*A; 5: *E. coli* (C-); 6: água.

4.5 Enumeração de Coliformes Termotolerantes

Do total de produtos cárneos analisados, 52,9% foram positivos para coliformes termotolerantes, que foram encontrados em 94,9% das amostras de coxa de frango, 59,4% de carne moída, 47,8% de lingüiça e 9,4% de salsicha. As populações de coliformes termotolerantes nas amostras de coxa de frango variaram de < 3,0 a $4,6x10^3$ NMP/g e, nas amostras de salsicha, lingüiça e carne moída de < 3,0 a ≥ $2,4x10^3$ NMP/g (Tabela 12). Conforme pode ser visto na Tabela 12, 65,4% das amostras estudadas apresentam contaminação por coliformes termotolerantes inferior a 10 NMP/g.

Tabela 12 – Distribuição das amostras de produtos cárneos analisados de acordo com o NMP de coliformes termotolerantes por grama.

População (NMP/g)	**Nº amostras positivas**				
	Salsicha (n=138)	**Lingüiça** (n=138)	**Carne moída** (n=138)	**Coxa de frango** (n=138)	**Total (%)** (N=552)
< 3	125	72	56	7	**260 (47,1)**
3 ┤ 10	10	26	28	37	**101 (18,3)**
10 ┤ 10^2	2	27	31	72	**132 (23,9)**
10^2 ┤ 10^3	0	7	12	18	**37 (6,7)**
> 10^3	1	6	11	4	**22 (4,0)**

4.5.1 Avaliação da correlação entre a população de coliformes termotolerantes e a presença dos patógenos nas amostras de produtos cárneos estudadas.

Foi observada associação entre a população de coliformes termotolerantes e a presença de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. nos produtos cárneos estudados ($p<0,05$). Na Tabela 13 estão apresentados os dados da população de coliformes termotolerantes e da positividade dos patógenos detectados.

Tabela 13 - Relação entre a população de coliformes termotolerantes e a positividade para *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. nas amostras analisadas.

NMP coliformes termotolerantes	**n**	**Positividade**		
		L. monocytogenes	***Salmonella* spp.**	***Campylobacter* spp.**
< 3	260	108 (41,5%)	3 (1,2%)	6 (2,3%)
3 ┤ 10	101	46 (45,5%)	4 (4%)	5 (5%)
10 ┤ 10^2	132	68 (51,5%)	15 (11,3%)	17 (12,9%)
10^2 ┤ 10^3	37	25 (67,6%)	4 (11%)	2 (5,4%)
> 10^3	22	22 (100%)	6 (27,3%)	3 (13,6%)

5. DISCUSSÃO

A produção mundial de carnes, principalmente de origem bovina, suína e de frangos, está em crescimento e o Brasil é um dos maiores produtores de carnes.

A bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando faturamento de mais de R$ 50 bilhões/ano e cerca de sete e meio milhões de empregos. Em 2008, o Brasil liderou o ranking dos maiores exportadores de carne bovina no mundo. Estes valores representaram uma participação de 28% do comércio internacional, exportando para mais de 170 países. O país tem consumo "per capita" em torno de 36,6 kg/ano. (ABIEC, 2009).

Quanto à carne suína, em 2008, o Brasil atingiu a cifra recorde de 1,48 bilhões de dólares em exportações, 20% a mais do que em 2007. O mercado interno esteve bem mais dinâmico do que no ano anterior, devido a uma série de fatores, como o aumento da produção de industrializados, principalmente de lingüiças, preços mais competitivos e ampliação da oferta de cortes frescos. Atualmente o consumo anual de carne suína é em torno de 14 kg por habitante (ABIPECS, 2009).

Já a carne de frango é considerada o segundo produto nas exportações de agronegócio e o sexto na pauta de exportações do país. O Brasil é o terceiro maior produtor e líder nas exportações de carne de frango, ocupando 40% de todo mercado mundial. Estima-se que são gerados nesta cadeia produtiva quatro milhões de empregos. Além disso, o Brasil apresenta um dos maiores índices de consumo médio de frango por habitante, entre 1995 e 2007, o consumo aumentou de 20 kg para 37,8 kg (UBA, 2008).

Considerando que os produtos cárneos podem ser veiculadores de microrganismos patogênicos e que o consumo destes produtos no Brasil é significativo (ABIEC, 2009; ABIPECS, 2009; UBA, 2008), o estudo da prevalência e quantificação de patógenos é importante para que se possa avaliar a exposição do consumidor à esses microrganismos e, posteriormente, avaliar o risco associado ao consumo desses alimentos.

Os dados obtidos neste estudo sobre a ocorrência de *Listeria monocytogenes* (48,7%), *Campylobacter* spp. (6,0%) e *Salmonella* spp. (5,8%) nas amostras de produtos cárneos analisados são de importância à saúde pública. O consumo destes produtos quando submetidos à cocção inadequada e/ou sujeitos à contaminação cruzada com outros alimentos prontos para o consumo pode levar a ocorrência de Enfermidades Transmitidas por Alimentos.

5.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes encontra-se amplamente disseminada na natureza e pode ser encontrada em diversos alimentos (CESARE et al., 2007; FILIOUSIS et al., 2009; GUDBJÖRUSDÓTTIR et al., 2004; JEMMI; STEPHAN, 2006; KARAKOLEV, 2009; MANFREDA et al., 2007; MENA et al., 2004; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Dados da literatura, em diferentes países, demonstram ampla variação na ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos. Em amostras de frango, a prevalência relatada varia de 1,31% na China (ZHOU; JIAO, 2006) até 70% na Estônia (PRAAKLE-AMIN; HANNINEN; KORKEALA, 2006); em amostras de carne bovina de 4,7% na Turquia (YÜCEL; ÇITAK; ÖNDER, 2005) até 34,9% na Espanha (VITAS; GARCIA-JALON, 2004) e em amostras de embutidos suínos de 3,7% na Espanha (CABEDO et al., 2008) até 42% na Itália (MELONI et al., 2009).

Na presente pesquisa, a positividade de *L. monocytogenes* nas amostras de produtos cárneos analisados (48,7%) foi mais elevada que a relatada na maioria dos estudos desenvolvidos no Brasil. Em relação à prevalência nas amostras de carne moída estudadas, o valor encontrado (59,4%) é inferior aos encontrados por Destro et. al. (1991) e Aragon-Alegro et al. (2008), que detectaram o patógeno em 65% (13/20) e 67,5% (27/40) das amostras de carne moída obtidas em supermercados de Campinas e São Paulo, respectivamente. Por outro lado, Mantilla et al. (2007) observaram uma freqüência bem mais baixa (6,7%) em amostras coletadas de estabelecimentos comerciais de Niterói, Rio de Janeiro.

Deve-se ressaltar que a moagem da carne tem um papel importante na positividade para *L. monocytogenes*, visto que Coutinho (2004) observou que este patógeno estava presente em apenas 1,8% das amostras de 110 cortes de carne bovina resfriada, coletadas no comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro. As carnes moídas são produtos muito manipulados e têm a área de contato com o ar aumentada pela moagem, facilitando a contaminação bacteriana. A higienização inadequada dos utensílios e máquinas de moer e os manipuladores podem ser as principais fontes de contaminação.

Quanto às regiões de coleta, as amostras de carne moída foram os únicos produtos em que a localização dos supermercados interferiu significativamente ($p<0,05$) na positividade para *L. monocytogenes*, sendo mais alta nas amostras procedentes dos supermercados localizados na região norte de São Paulo. Diferenças na freqüência e eficiência de limpeza dos equipamentos de moagem, tempo de moagem e/ou armazenamento inadequado do produto nestes supermercados podem ter contribuído para os resultados observados.

Nas amostras de coxa de frango, a ocorrência de *L. monocytogenes* (58%) foi similar ao relatado por Reiter et al. (2005), que detectaram o patógeno em 60% das amostras de coxa de frango congeladas e em 50% das de coxa de frango refrigeradas, provenientes de uma planta processadora da região sudeste do Brasil. Por outro lado, outros estudos revelaram índices mais baixos de isolamento de *L. monocytogenes* em carne de frango. Em um estudo relatado por Lage (1993), a ocorrência em amostras de carne de frango (carcaças, peitos e coxas com sobrecoxas) coletadas no comércio varejista de Belo Horizonte foi de 4,4%, enquanto Pelisser et al. (2001) encontraram uma prevalência de 23% em carcaças de frango refrigeradas coletadas em supermercados de Florianópolis. Baldassi et al. (2005) detectaram a bactéria em apenas 1,3% das amostras de carne de frango (coxa, sobrecoxa, peito, frango inteiro e cortado) coletadas de abatedouros do Estado de São Paulo, enquanto Barbalho et al. (2005) encontraram positividade para o microrganismo em 14,3% de carcaças de frango de um frigorífico localizado na Bahia.

Segundo estudo de Chiarini et al. (2009) realizado em dois abatedouros de aves localizados na região sudeste do Brasil, *L. monocytogenes* estava

amplamente disseminada nas diversas áreas, com maior ocorrência nas salas de corte desses estabelecimentos. Nestes locais as carnes de frango eram mantidas em refrigeração a 10 ºC (temperatura favorável ao desenvolvimento de *L. monocytogenes*) e a limpeza das salas era realizada com maior freqüência do que nas demais áreas analisadas, o que reduzia a microbiota competidora e favorecia o desenvolvimento de *L. monocytogenes*.

Em relação às amostras de salsicha, a freqüência de *L. monocytogenes* observada no presente estudo (37,7%) foi maior que a relatada por Aragon-Alegro et al. (2008) e Pettinati et al. (2006), que detectaram *L. monocytogenes* em 27,6% e 14% das amostras de salsicha coletadas no comércio varejista de São Paulo, respectivamente, e por Silva (1996) que isolou *L. monocytogenes* em 6,6% das amostras de lingüiça de porco e de frango produzidas artesanalmente e comercializadas em feiras livres e pequenos comércios varejistas em Contagem, Minas Gerais. Por outro lado, freqüência bem mais alta que a obtida neste estudo (80%) foi observada por Destro et. al. (1991), em amostras de salsicha de supermercados da cidade de Campinas, São Paulo.

L. monocytogenes foi detectada em 39,8% das amostras de lingüiça analisadas no presente estudo, resultado semelhante foi observado por Miyasaki et al. (2009) que detectaram a bactéria em 42% das amostras coletadas em supermercados do município de São Paulo. Ocorrência maior foi observada por Destro et. al. (1991), que relataram a presença do patógeno em 70% das amostras analisadas.

Estudo realizado por Silva et al. (2004) em três frigoríficos de Pelotas, Rio Grande do Sul, indicou que a ocorrência de *L. monocytogenes* nas matérias-primas utilizadas para a fabricação de lingüiça (29,4%) foi mais alta do que a observada no produto final (16,7%). Os autores inferiram que durante o processamento da lingüiça, os efeitos conjugados de cloreto de sódio, sais de cura (nitrito) e pH baixo poderia ter controlado a multiplicação do microrganismo ou ocasionado estresse nas células bacterianas, dificultando o isolamento pelas metodologias convencionais. Entretanto, outro estudo realizado em uma planta processadora de lingüiça no Rio Grande do Sul indicou a ocorrência de *L. monocytogenes* em todas as amostras de lingüiça analisadas, mas nenhuma

das amostras de matéria-prima continha o microrganismo, indicando que a contaminação ocorreu durante o processamento (VON LAER et al., 2005).

A ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos crus no comércio, geralmente é mais alta do que a observada nas etapas iniciais de processamento, indicando que a contaminação pode ocorrer e também aumentar durante o processamento (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004). Segundo Thevenot; Dernburg; Vernozy-Rozand (2006) as etapas de resfriamento e de corte das carnes suínas podem ser responsáveis pelo aumento da prevalência de *L. monocytogenes* no produto final.

Com o amadurecimento do conceito de avaliação de risco como ferramenta para estimar a gravidade de uma contaminação de alimentos por *L. monocytogenes* e as conseqüências para saúde do consumidor, é necessário conhecer não apenas a prevalência do patógeno nos produtos analisados, mas também o nível de contaminação. No presente estudo verificou-se que os produtos cárneos estudados apresentaram contagens baixas de *L. monocytogenes*, variando de < 10 até no máximo $4,5x10^3$ UFC/g, encontrada em uma amostra de carne moída.

Miyasaki et al. (2009), que também realizaram contagens de *L. monocytogenes* em amostras de lingüiça frescal coletadas em supermercados do município de São Paulo, observaram que os resultados estavam abaixo de 100 UFC/g para as 100 amostras analisadas. Também no estudo de Meloni et al. (2009) com embutidos (lingüiça, salame, entre outros) comercializados na Itália, todas as amostras apresentaram contagens abaixo de 10 UFC/g. Capita e Alonso-Calleja (2003), na Espanha, também detectaram baixas quantidades do patógeno (< 100 UFC/g) nas amostras de carcaça de frango analisadas. Portanto é possível observar, que os dados de quantificação de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, embora escassos, indicam que a contaminação é inferior a 100 UFC/g.

Deve ser salientado que, mesmo com contaminação baixa, os produtos cárneos oferecem um risco à saúde pelo fato de *L. monocytogenes* se multiplicar em temperatura de refrigeração. Deste modo, deve-se evitar a manipulação inadequada desses produtos, que podem contaminar outros alimentos,

equipamentos, utensílios ou manipuladores. Além disso, a cocção inadequada ou o consumo desses alimentos sem tratamento térmico, principalmente por pessoas consideradas de risco, pode ocasionar casos ou surtos de listeriose.

Pelo fato de *L. monocytogenes* serem bactérias psicrotróficas e os produtos cárneos serem armazenados a temperatura de refrigeração, a prevenção e o controle da contaminação desses microrganismos nesses alimentos são desafios difíceis de serem vencidos (NØRRUNG, 2000; THEVENOT; DERNBURG; VERNOZY-ROZAND, 2006). Em amostras de salsicha, *L. monocytogenes* pode aumentar 1,5 log durante o armazenamento por 7 dias a 7 ºC (SIMPSON BEAUCHAMP et al., 2010). Portanto, considerando que, geralmente, os refrigeradores domésticos têm uma temperatura média entre 4 a 9 ºC, a presença do patógeno nesse tipo de produto pode ser um risco à saúde do consumidor, agravado pelo fato de algumas pessoas consumirem salsichas sem cozimento.

O método analítico utilizado para verificar se um alimento contém *L. monocytogenes* tem um papel importante na positividade encontrada. No presente trabalho, observou-se que os métodos de detecção e de enumeração propostos pela ISO (ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004 e ISO 11290-2:1998, respectivamente) não apresentaram a mesma eficiência na detecção das amostras positivas. Em 13% das amostras positivas (25 de carne moída, cinco de coxa de frango, três de lingüiça e duas de salsicha), a presença de *L. monocytogenes* foi detectada somente quando o método de contagem foi utilizado, não sendo isolada pelo método de detecção em 25 g do produto. A utilização de duas metodologias, simultaneamente, com o emprego de dois meios seletivos, permitiu uma melhor avaliação da contaminação dos produtos estudados com *L. monocytogenes*.

Dos produtos cárneos analisados, verificou-se que a contaminação com outras espécies de *Listeria* foi elevada (84,8% das amostras), sendo *L. innocua*, a espécie mais freqüente (63,9%). Esses dados corroboram a maioria dos resultados descritos na literatura, nacional e internacional, que indicam que *L. innocua* é a espécie mais comum em alimentos (BARBALHO et al., 2005; CHEN et al., 2009; CHIARINI et al., 2009; DESTRO et al., 2001; SILVA et al., 2004;

VITAS; GARCIA-JALON, 2004; VON LAER et al., 2005; YÜCEL; ÇITAK; ÖNDER, 2005). Embora *L. innocua* não seja uma espécie patogênica, sua presença em alimentos pode ser indicativa da possível presença de *Listeria monocytogenes* (BRUHN et al., 2005; CORNU; KALMOKOFF; FLANDROIS, 2002). Segundo Bruhn et al. (2005), as etapas de enriquecimento utilizados na metodologia laboratorial para pesquisa de *L. monocytogenes* podem favorecer a multiplicação de outras espécies de *Listeria*, como *L. innocua* dificultando o isolamento de *L. monocytogenes*. Além disso, alguns autores sugerem que *L. innocua* pode produzir componentes inibitórios que dificultam a detecção de *L. monocytogenes* quando a contaminação pelo patógeno é baixa (CORNU; KALMOKOFF; FLANDROIS, 2002).

A sorotipagem é uma importante ferramenta epidemiológica para avaliação da prevalência de sorotipos patogênicos, auxiliando no controle de *L. monocytogenes*. No presente estudo, observou-se ampla diversidade de perfis de sorotipagem nas cepas de *L. monocytogenes* isoladas dos produtos cárneos, com distribuição relativamente uniforme dos quatro grupos de sorotipos estudados: 28,7% das cepas pertenceram ao Grupo 1 (1/2a e 3a), 21,0% ao Grupo 2 (1/2c e 3c), 17,0% ao Grupo 3 (1/2b, 3b e 7) e 13,8% ao Grupo 4 (4b, 4d e 4e).

Em 18,8% das cepas foi detectado um perfil atípico. Nessas cepas houve amplificação de quatro fragmentos de DNA, um dos quais característico do gênero *Listeria* (370 pb), dois característicos do Grupo 1 (471 pb e 597 pb) e um característico do Grupo 4 (691 pb). Esse perfil atípico não consta na publicação de Doumith et al. (2004), onde está descrita a metodologia de sorotipagem molecular utilizada no presente estudo. Entretanto, segundo Dr. Doumith (informação pessoal)[1], atualmente reconhece-se que isolados do sorotipo 4b podem amplificar o gene *lmo0737* (Grupo 1), provavelmente devido à transferência horizontal do gene. Vasconcelos et al. (2008) também identificaram esse perfil molecular em uma cepa de *L. monocytogenes* isolada de uma amostra de fluído cérebro-espinhal de um recém-nascido prematuro, cuja mãe havia consumido queijo gorgonzola e passado mal. Além da sorologia molecular, os autores submeteram a cepa à sorologia convencional e seqüenciamento do gene

[1] Doumith, M. Sorotipagem Molecular de *L. monocytogenes*. Mensagem para car@usp.br em 13 jan. 2010.

lmo0737, verificando que a mesma pertencia ao sorotipo 4b. Seguindo este raciocínio, é possível que as cepas atípicas do presente estudo sejam 4b. Neste caso, o sorotipo 4b seria o mais comum (32,6%) nas amostras estudadas. Mas infelizmente, não foi possível fazer sorotipagem pelo método convencional utilizando antisoro específico.

O resultado da sorotipagem das cepas de *L. monocytogenes* isoladas nos produtos cárneos estudados é bastante preocupante considerando que no Brasil, os sorotipos predominantes isolados de amostras clínicas associadas à listeriose são 4b e 1/2a (HOFER; REIS; HOFER, 2006; HOFER; RIBEIRO; FEITOSA, 2000; LEMES-MARQUES; CRUZ; DESTRO, 2007) e que o sorotipo 4b é o causador da maioria dos surtos de listeriose (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Foi observado que a predominância dos grupos sorológicos de *L. monocytogenes* variou de acordo com o tipo de produto cárneo analisado: nas amostras de lingüiça e coxa de frango predominou o Grupo 1 (1/2a e 3a), com 45,8% e 41,9% das cepas, respectivamente, enquanto nas amostras de salsicha foi observada a predominância (41,8%) das cepas do Grupo 3 (1/2b, 3b e 7). Nas amostras de carne moída, predominaram (33,7%) as cepas com comportamento atípico e, portanto, consideradas não tipáveis. Das tipáveis, 90,5% estavam distribuídas entre os Grupos 2, 3 e 4 com freqüências de 29,5%, 15,8% e 14,7%, respectivamente. Em 7,7% das amostras houve o isolamento concomitantemente de dois tipos de perfil molecular, demonstrando que uma amostra pode estar contaminada com mais de um tipo de sorotipo de *L. monocytogenes*.

A diversidade de sorotipos de *L. monocytogenes* em produtos cárneos já foi observada por outros autores no Brasil. Chiarini et al. (2009) verificaram a prevalência de cepas do Grupo 1 (72,9%), seguido do Grupo 2, em uma planta processadora de aves na região sudeste do Brasil. Resultados semelhantes também foram encontrados por Barbalho et al. (2005), que detectaram os sorotipos 1c e 1b, em carcaças coletadas na linha de empacotamento de uma planta processadora de aves localizada na Bahia. Miyasaki et al. (2009) relataram a predominância dos sorotipos 4c ou 4a (65,5%), seguido dos Grupos 1 e 4 (10,3%) e Grupo 3 (6,9%). Em amostras de salsicha, Pettinati et al. (2004) relataram a predominância dos sorotipos 1/2a (41,2%) e 1/2c (41,2%), seguido do

sorotipo 4b (17,6%). Mantilla et al. (2007) observaram a prevalência dos sorotipos 4b e 1/2c em amostras de carne moída.

5.2 *Salmonella* spp.

Nos últimos anos, o número de surtos causados por *Salmonella* spp. tem aumentado consideravelmente a nível mundial, tanto em países em desenvolvimento como nos países desenvolvidos. Atualmente *Salmonella* spp. é o agente etiológico mais comumente envolvido em casos e surtos de enfermidades transmitidas por alimentos em inúmeros países, inclusive o Brasil (GEIMBA et al., 2004; GERNER-SMIDT; WHICHARD, 2007; GREIG; RAVEL, 2009; HUGHES; GILLESPIE; O'BRIEN, 2007; MUCH et al., 2009; BRASIL, 2008; VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006).

Mundialmente, verifica-se que a positividade para *Salmonella* spp. em produtos cárneos varia consideravelmente de acordo com o país e produto cárneo considerado. Na Irlanda, por exemplo, a positividade em lingüiças suínas relatada por Boughton et al. (2004) foi baixa (1,7%), enquanto no México foi relatada uma positividade de 88,3% (ESCARTIN et al., 1999).

No presente estudo, foi observado que *Salmonella* spp. foi mais freqüente em amostras de lingüiça do que nos demais produtos estudados. Nessas amostras foi encontrada uma positividade de 14,5%, com predominância dos sorovares *S.* Typhimurium (45%) e *S.* Derby (20%). Resultados semelhantes foram encontrados por Spricigo et al. (2008), em amostras de lingüiça tipo frescal, coletadas no comércio de Lages em Santa Catarina, sendo que *Salmonella* foi detectada em 12,8% das amostras, também com prevalência do sorovar *S.* Typhimurium. Por outro lado, Cortez (2003) analisando 106 amostras de lingüiças de frango, suína e mista comercializadas no município de Jaboticabal, em São Paulo, detectou a bactéria em 7,5% das amostras. Marques et al. (2006) e Salvatori; Bessa e Cardoso (2003) não detectaram o patógeno em 40 amostras de lingüiça adquiridas em estabelecimentos comerciais, em Minas Gerais e em 70 amostras de embutidos frescos (lingüiça crua e derivados) provenientes de

comércios varejistas, em Porto Alegre, respectivamente. Freqüências mais elevadas foram observadas por Mürmann; Santos e Cardoso (2009) que detectaram *Salmonella* spp. em 24,4% de amostras de lingüiça frescal, coletadas no comércio varejista de Porto Alegre.

Em relação às populações de *Salmonella* spp. nas amostras de lingüiça, as contagens variaram de < 0,3 a 9,3x10 NMP/g. Contagens baixas foram também observadas por Prendergast et al. (2008), na Irlanda, em amostras de carne de porco (< 0,03 a 0,36 NMP/g) e Mürmann; Santos e Cardoso (2009), no Brasil, em que a maioria das amostras de lingüiça (85,5%) apresentaram contagens de até 1,0 NMP/g.

Segundo estudo realizado por Delhalle et al. (2009), que pesquisaram a presença de *Salmonella* spp. nas diferentes etapas de processamento de carne suína e também em amostras do varejo, na Bélgica, as carcaças contaminadas podem explicar a contaminação do produto acabado, comprovando que uma carcaça contaminada pode ser responsável pela disseminação da bactéria no ambiente de processamento. No Brasil, Borowsky; Schmidt e Cardoso (2007) detectaram uma alta freqüência de *Salmonella* spp. (93,3%) em amostras de carne suína moída utilizada como matéria-prima de lingüiças indicando que as lingüiças produzidas nos estabelecimentos que fizeram parte do estudo apresentavam risco à população consumidora.

Múltiplos fatores podem causar a contaminação de carcaças de suínos, tais como o tempo de espera dos animais até o momento do abate e a superlotação nas baias dos abatedouros. Em condições de estresse, os animais portadores de *Salmonella* spp. excretam maior quantidade de microrganismos nas fezes, facilitando a disseminação entre os animais (LO FO WONG et al., 2002).

A positividade para *Salmonella* spp. em suínos parece variar de acordo com a região. Amostras de suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul apresentaram uma alta freqüência de *Salmonella* spp. (55,7%) nas fezes e linfonodos, sendo *S.* Typhimurium o sorovar mais isolado (BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004). Entretanto, uma freqüência mais baixa (16,6%) foi observada por Silva et al. (2009), em linfonodos e tonsilas de animais procedentes de frigoríficos localizados no Mato Grosso do Sul. Segundo os autores, os suínos em

Mato Grosso do Sul são submetidos a condições menos estressantes que nos demais estados, pois não há mistura de lotes de diferentes propriedades, e o tempo de permanência dos animais em currais pré-abate é menor, porque o número de animais abatidos por lote é menor.

A prevalência dos sorovares *S.* Typhimurium e *S.* Derby em suínos encontrada neste estudo foi também observada nos estudos de Mürmann; Santos e Cardoso (2009) e Spricigo et al. (2008) no Brasil. Em 2005, nos Estados Unidos, essa prevalência também foi relatada (FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2008).

Na presente pesquisa, *Salmonella* spp. foi também detectada em 8,7% das amostras de coxa de frango. Freqüências de isolamento semelhantes foram observados em outros estudos: 6,7% em amostras de coxa de frango refrigeradas de um abatedouro do sul do Brasil (REITER et al., 2007), 10,5% de cortes de frango coletados em supermercados e açougues de Pelotas (BAÚ; CARVALHAL; ALEIXO, 2001) e 13,3% de coxas e sobrecoxas de frango procedentes de frigoríficos da região Nordeste do Estado de São Paulo (CARVALHO; CORTEZ, 2005). Contudo, uma maior ocorrência (39,3%) foi verificada por Ribeiro et al. (2007) em cortes de frango procedentes de uma planta processadora do sudeste do Brasil.

Em relação à *Salmonella* spp. em carcaças de frango, a positividade relatada em diferentes estudos é bastante variável: 50% em amostras coletadas em feiras e mercados em Manaus (TIROLLI; COSTA, 2006), 42% em amostras de abatedouros em Mauá (FUZIHARA; FERNANDES; FRANCO, 2000), 32% em amostras congeladas obtidas no comércio varejista de Jaboticabal (SANTOS et al., 2000), 7,2% (26/360) em amostras congeladas adquiridas no comércio varejista do Estado de São Paulo (RISTORI et al., 2008), 5,9% (6/120) em amostras refrigeradas comercializadas em Bauru (MATHEUS; RUDGE; GOMES, 2003) e 2,5% (3/116) em amostras provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo (TESSARI et al., 2008).

Prevalências mais altas que as obtidas no presente estudo foram observadas por autores de diversos países, tanto em amostras de carcaças quanto em cortes de frango. Capita et al. (2003), na Espanha, detectaram *Salmonella* spp. em 55% das amostras de carcaças de frango e em 40% de coxa

de frango coletadas no comércio varejista. Miranda et al. (2009), no México, observaram uma prevalência de *Salmonella* spp. de 35,3% das amostras de cortes de frango coletadas em supermercados locais. Bohaychuk et al. (2006), no Canadá, analisando amostras de produtos cárneos refrigerados coletados no comércio varejista, detectaram uma ocorrência da bactéria de 30% em amostras de coxa de frango. Já Berrang et al. (2009), em um estudo realizado em 20 estabelecimentos processadores de frango nos Estados Unidos, relataram que a positividade para *Salmonella* spp. nas amostras de carcaças de frango coletadas pós-resfriamento variou de 2,5% até 60%, dependendo do estabelecimento analisado.

Entre os sorovares detectados nas amostras de coxa de frango, o mais freqüente foi *S.* Enteritidis (33,3%), seguido de *S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:c:z35 (16,7%) e *S.* Brandenburg (16,7%); confirmando os dados de diversos países, inclusive do Brasil, que *S.* Enteritidis é o sorovar mais comum em carne de frango (BAÚ, CARVALHAL; ALEIXO, 2001; FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2008; MATHEUS; RUDGE; GOMES, 2003; RIBEIRO et al., 2007; SANTOS et al. 2000; TAVECHIO et al., 2002).

No Estado de São Paulo, a partir de 1993 a freqüência de isolamento do sorovar de *S.* Enteritidis aumentou significativamente em alimentos, principalmente em produtos avícolas, e desde 1994 é o sorovar mais associado à doenças de origem alimentar (FERNANDES et al., 2006; TAVECHIO et al., 1996; TAVECHIO et al., 2002).

S. *enterica* subespécie *diarizonae* foi também um sorovar freqüente no presente estudo. Esse sorovar é mais comum em animais de sangue frio, principalmente répteis (POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2003; SÁ; SOLARI, 2001), e sua presença em produtos cárneos pode ser decorrente da contaminação ambiental nos locais de criação de frangos. Na literatura consultada, não foram encontrados dados de isolamento de S. *enterica* subsp. *diarizonae* em amostras de frango. Segundo Tavechio et al. (2002) menos de 1% das cepas de fontes não humanas (alimentos, ambiente e de animais) analisadas em São Paulo no período de 1996 a 2000, pertenceram ao sorovar S. *enterica* subsp. *diarizonae* 61:c:-. No Estado de São Paulo, este sorovar foi, pela primeira

vez, observado em amostras clínicas provenientes da região de Cotia (FERNANDES et al., 2006).

Ainda é importante destacar a detecção do sorovar *S.* I 4,[5],12:i:-, tanto nas amostras de lingüiça como nas de coxa de frango. Esse sorovar tem sido incriminado em surtos de ETA nos últimos anos (FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2008; SWITT et al., 2009), e no Brasil, está entre os três sorovares mais freqüentemente isolados de amostras clínicas (FERNANDES et al., 2006).

Com relação aos dados de enumeração de *Salmonella* spp., entre as 12 amostras de coxa de frango positivas, o microrganismo foi detectado em apenas quatro amostras pela técnica do NMP e as populações variaram de < 0,3 a 0,91 NMP/g. Embora muitos estudos sobre a ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças e cortes de frango já tenham sido realizados no Brasil, os dados sobre a quantificação do microrganismo ainda são escassos. Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), coordenou o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), no qual foram analisadas 360 amostras de carcaças de frango congeladas, coletadas no comércio varejista do Estado de São Paulo, no período de setembro de 2004 a junho de 2006. Entre as amostras analisadas, 72 foram submetidas à quantificação de *Salmonella* pelo método do NMP/g, sendo obtidos valores entre < 0,3 e $2,3x10^3$ NMP/g (RISTORI et al., 2008). Entretanto, deve-se ressaltar que apenas uma das amostras positivas apresentou a contagem de $2,3x10^3$ NMP/g, sendo que as demais apresentaram contagens entre 0,036 e 0,092 NMP/g. No presente estudo, as contagens também foram baixas, embora ligeiramente superiores aos obtidos no programa PREBAF.

Um dos poucos estudos feitos em outros países de enumeração de *Salmonella* spp. em frango é o de Straver et al. (2007), realizado na Noruega com amostras coletadas no comércio varejista. A maioria das amostras positivas (68,4%) apresentou baixas populações, com contagens variando de 1,0 até 1,81 log NMP por filé de frango.

Segundo Rasschaert et al. (2008) a fonte de contaminação mais importante de *Salmonella* spp., em carcaças de frango, são os equipamentos utilizados no abatedouro e as gaiolas de transporte. A contaminação por material

gastrintestinal, durante o abate, pode não ser o principal fator associado com a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças, entretanto a adoção de boas práticas durante o abate de frangos é essencial para minimizar os riscos de contaminação.

Geralmente a contaminação de carnes cruas com *Salmonella* spp. não é considerada um risco ao consumidor, uma vez que se espera que o alimento seja cozido antes do consumo, eliminando assim o patógeno. Na maioria dos países, não há normas quanto à ausência de *Salmonella* spp. em produtos de frango crus. Também no Brasil, a Resolução RDC Nº 12/2001 não fixou parâmetro para *Salmonella* spp. em carnes *in natura* de aves (ANVISA, 2001a). No entanto, a presença desse patógeno em amostras de cortes de frango reforça a importância da aplicação de normas de orientação para o consumidor, como a Resolução RDC nº 13/2001 (regulamento técnico para instrução de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados) para prevenção da ocorrência de surtos associados a esse patógeno, principalmente por cocção inadequada (ANVISA, 2001b). É importante ressaltar que alimentos com *Salmonella* spp. podem ser fonte de contaminação cruzada de outros alimentos, podendo causar doenças (CAPITA et al., 2003).

Ainda, a adoção de medidas higiênico-sanitárias no manuseio e processamento de aves, o controle de rações e alimentos desses animais, a rígida adoção de práticas higiênicas na criação, transporte e abate, a separação das operações industriais com matérias-primas daquelas com produtos em processo ou terminados, a adoção de programas de limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos, e a prevenção de contaminações cruzadas, são medidas importantes que contribuem para a redução dos níveis de contaminação.

Com relação aos demais produtos cárneos analisados no presente estudo, *Salmonella* spp. não foi detectada em nenhuma das amostras de salsicha e carne moída estudadas. Nos escassos estudos realizados no Brasil com amostras de salsicha, o patógeno não foi detectado (CURI, 2006; MARTINS et al., 2008; RODRIGUES et al., 2003), sugerindo que *Salmonella* spp. não é um microrganismo de relevância nesse tipo de produto.

Mundialmente, a prevalência deste microrganismo em carne bovina também é baixa (PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006; RHOADES; DUFFY;

KOUTSOUMANIS, 2009). Entretanto, a pesquisa da bactéria nessas amostras é importante, pois os surtos envolvendo os produtos cárneos continuam ocorrendo (FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2008; MÜRMANN; SANTOS, CARDOSO, 2009; NADVORNY; FIGUEIREDO; SCHMIDT, 2004; TAVECHIO et al., 2002).

Apesar da comparação de metodologias para *Salmonella* spp. não fazer parte dos objetivos da presente pesquisa, observou-se que o método de detecção permitiu identificar um maior número de amostras positivas que o método de enumeração, certamente devido aos baixos níveis de contaminação. Os métodos qualitativos são sempre mais sensíveis que os métodos quantitativos quando a população é baixa (STRAVER et al., 2007).

5.3 *Campylobacter* spp.

Os estudos de prevalência de *Campylobacter* termofílicos em amostras de frango do comércio varejista indicam que a positividade varia de acordo com o país, podendo ser de 8,1% até 100% (GHAFIR et al., 2007; HUMPHREY; O´BRIEN; MADSEN, 2007; MEDEIROS et al., 2008; MELDRUM et al. 2005; MENA et al., 2008; PEZZOTTI et al., 2003; SALLAM, 2007; SCHERER et al., 2006; TAREMI et al., 2006; VINDIGNI et al., 2007; WILSON, 2002; WONG et al., 2007). A espécie mais isolada neste tipo de produto cárneo é *C. jejuni* (SUZUKI; YAMAMOTO, 2009).

No Brasil, as pesquisas mostram que a freqüência de isolamento de *Campylobacter* spp. em frangos varia independente do tipo de amostra estudado e do local onde as amostras são coletadas. Em amostras de carcaças de frango obtidas de indústrias e aviários, já foram relatados os seguintes resultados: 63,3% em amostras adquiridas na região sul do Brasil (FRANCHIN; OGLIARI; BATISTA, 2007), 60% nas coletadas no Rio de Janeiro (AQUINO et al., 2002), e 38% e 2% de abatedouros não industrializados e industrializados, respectivamente, em Belo Horizonte, Minas Gerais (DIAS et al., 1990). Quanto às amostras de cortes de

frango, verificou-se que a positividade variou de 6,7% nas amostras procedentes da região sudeste do país (REITER et al. 2005) até 62,5% nas amostras coletadas em Niterói, no Rio de Janeiro (AQUINO et al., 1996).

Observa-se que nos estudos sobre a ocorrência de *Campylobacter* termofílico em amostras de frango coletadas no comércio varejista, os resultados são similares aos obtidos no presente estudo em que 19,6% (27/138) das amostras foram positivas para esta bactéria. No Canadá, Medeiros et al. (2008) verificaram que a positividade para *Campylobacter* spp. nas amostras de frango adquiridas em supermercados foi de 19%, praticamente a mesma positividade encontrada no presente estudo. Augusto Filho (2001) detectou o microrganismo em 25,2% (101/400) das amostras de carcaças de frango de Botucatu, São Paulo e entre os isolados, *C. jejuni* foi o mais freqüente. Diferentemente do observado por Sakuma; Franco; Fernandez (1992), que relataram uma ocorrência mais baixa (13,5%), em carcaças, cortes e miúdos de frango da cidade de São Paulo, e predominância de *C. coli*, a mesma do presente estudo.

Segundo Franchin; Aidoo e Batista (2005), que analisaram oito aviários da região Sul do Brasil, antes do abate os frangos podem apresentar uma elevada contaminação por *Campylobacter* termofílicos. Os autores detectaram uma alta freqüência dessas bactérias (75%) na cloaca das aves, sugerindo que a contaminação intestinal é a principal fonte de contaminação. As amostras de penas também foram positivas, indicando que a presença desses microrganismos em camas de aviário, gaiolas, penas e parapeitos torna a carne de aves susceptível à contaminação cruzada, aumentando o risco da presença de *Campylobacter* no produto final. Um estudo semelhante realizado em seis abatedouros de aves do Estado de São Paulo indicou uma positividade mais baixa (4,9%). No entanto, entre as amostras analisadas de fezes, penas, água (de escaldamento, evisceração e resfriamento) e água de enxaguadura de carcaças, as de fezes (22%) foram as que apresentaram maior taxa de contaminação (CORTEZ et al., 2006). A água de resfriamento do *chiller* também pode ser uma das principais fontes de contaminação cruzada de *Campylobacter* termofílico em carcaças de frango (FRANCHIN; OGLIARI; BATISTA, 2007).

Com relação às amostras de carne bovina moída, a prevalência encontrada para *C. jejuni* (4,5%) foi similar à encontrada por Little et al. (2008) nos Estados Unidos e por Wong et al. (2007) na Nova Zelândia, que observaram 4,9% e 3,5% de positividade nas amostras de carne bovina adquiridas no varejo, respectivamente. Por outro lado, os resultados são superiores aos obtidos na Bélgica de 0,6% (GHAFIR et al., 2007), na Coréia de 1,2% (HONG et al., 2007), na Itália de 1,3% (PEZZOTTI et al., 2003) e na Tailândia de 2% (VINDIGNI et al., 2007), mas inferiores ao relatado no Irã, de 10% (TAREMI et al., 2006).

No presente estudo, *Campylobacter* spp. não foi detectado em nenhuma das amostras de salsicha e lingüiça. Medeiros et al. (2008) e Bohaychuk et al. (2006), no Canadá, também não detectaram o patógeno em carne suína, ao contrário de outros estudos que observaram a presença de *Campylobacter* spp. em produtos cárneos de origem suína, de 10,3% na Itália (PEZZOTTI et al., 2003), 9,1% na Nova Zelândia (WONG et al., 2007), 6,3% nos Estados Unidos (LITTLE et al., 2008) e 2,5% na Bélgica (GHAFIR et al., 2007). No Brasil, não foram encontrados outros estudos sobre a ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne bovina, salsicha e lingüiça.

Durante as etapas de processamento de produtos cárneos, o tratamento térmico, resfriamento e o congelamento podem causar redução do número de *Campylobacter* spp. ou sua eliminação (GHAFIR et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008), o que pode explicar a ausência deste patógeno nas amostras de salsicha e lingüiça estudadas.

Os dados encontrados neste estudo e os reportados em outros países comprovam que *Campylobacter* termofílicos não são patógenos de significância em produtos cárneos de origem bovina e suína. Diferentemente do que ocorre nos países desenvolvidos, em países em desenvolvimento a campilobacteriose está relacionada com hábitos precários de higiene, afetando principalmente crianças (YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007). Deve-se ressaltar que no Brasil há poucos dados a respeito deste microrganismo, tanto em estudos clínicos como com alimentos, dificultando a avaliação do impacto da sua presença em alimentos para a saúde da população.

5.4 *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC)

Neste estudo, não foram detectadas cepas de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em nenhuma das amostras analisadas. O mesmo foi observado nos Estados Unidos por Zhao et al. (2001) que analisaram 825 amostras de produtos cárneos (carne suína, bovina e de aves) coletadas em supermercados na cidade de Washington. No Brasil, Ristori et al. (2006) também não detectaram cepas de STEC nas 100 amostras de carne moída bovina crua adquiridas no comércio varejista do município de São Paulo, apesar de utilizarem a metodologia de separação imunomagnética que permite detectar baixas concentrações de patógenos.

Apesar da baixa freqüência de infecções humanas comprovadamente causadas por STEC no Brasil, este patógeno já foi detectado em carcaças de bovinos (RIGOBELO et al., 2008), carne bovina moída (BERGAMINI et al., 2007; CERQUEIRA; TIBANA; GUTH, 1997; RODOLPHO; MARIN, 2007) e, principalmente, em fezes de animais (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; CERQUEIRA et al., 1999; FARAH et al., 2007; LEOMIL et al., 2003; RIGOBELO et al., 2006; SANTOS et al., 2007; SOUZA et al., 2007; TIMM et al., 2007). Não foram encontrados relatos sobre a pesquisa dessas bactérias em amostras de carnes suínas e de aves no Brasil.

Ao contrário do observado no Brasil, outros países relataram a ocorrência de STEC em produtos cárneos de aves e de suínos (MAINIL; DAUBE, 2005). Lee et al. (2009) detectaram cepas de STEC em 7,3% de amostras de carne de frango e em 2% de carne suína adquiridas no comércio varejista da Coréia. Mayrhofer et al. (2004), analisando amostras de produtos cárneos adquiridos no comércio varejista da Áustria, observaram que as prevalências de STEC em carnes bovina e suína foram de 5,2% e 1,7%, respectivamente, e que o patógeno estava ausente nas amostras de frango e de carne bovina moída estudadas. Bohaychuk et al. (2006) analisaram 800 amostras de produtos cárneos (carne suína, bovina e de aves, incluindo salsichas de frango e de carne bovina) no Canadá e detectaram cepas de STEC em 1% das amostras de carne bovina moída. Em Marrocos, Beneduce et al. (2008) reportaram que 3% das amostras de carne

moída bovina e salsicha bovina cruas adquiridas em açougues foram positivas para STEC. Na Suíça, Fantelli; Stephan (2001), analisando 400 amostras de carne moída bovina e suína coletadas em açougues, detectaram STEC em 1,7% das amostras e isolaram cinco sorotipos diferentes, nenhum deles pertencente ao sorotipo O157:H7.

Barlow; Gobius; Desmarchelier (2006), na Austrália, em um levantamento durante um período de 52 semanas, encontraram STEC em 16% das amostras de carne moída e em 40% de carne de cordeiro adquiridas em diferentes estabelecimentos comerciais. Na França, Perelle et al. (2007) detectaram STEC em 15% das 300 amostras de carne moída crua, coletadas em diferentes regiões. Entretanto, em apenas 2,6% das amostras as cepas pertenceram aos sorogrupos patogênicos O26, O103, O111, O145 e O157. Na Argentina, Oteiza et al. (2006) detectaram STEC em três das 100 amostras de “morcillas” (tipo de chouriço) adquiridas no comércio varejista.

No Brasil, Bergamini et al. (2007) estudaram a ocorrência de STEC em amostras de carne bovina moída comercializadas em duas cidades do Estado de São Paulo. Das 250 amostras analisadas, a bactéria foi detectada em quatro amostras (3,5%), sendo identificados os seguintes sorotipos O93:H19, ONT:HNT, ONT:H7 e O174:HNT. Rigobelo et al. (2008), analisando amostras de carcaças bovinas de abatedores em São Paulo, detectaram STEC em 1,4% das amostras. Rodolpho; Marin (2007) pesquisaram STEC em 91 amostras de carne moída, 154 de moedores de carne e 42 de mãos de funcionários em 23 açougues de Taquaritinga, no noroeste do Estado de São Paulo. STEC foi detectada em 2,1% das amostras de carne moída e 1,2% das amostras de moedores de carne, e estava ausente nas amostras de mãos.

Desde o primeiro relato de surto por *E. coli* O157:H7 ocorrido em 1981 (RILEY et al., 1983), os meios de cultura para pré-enriquecimento e isolamento de cepas de STEC vêm sendo constantemente modificados visando melhorar sua eficiência já que, quando presentes em alimentos, esses microrganismos estão em quantidades muito baixas. Entretanto, nenhum desses meios de cultura permite a detecção de todos os sorogrupos de STEC. Além disso, uma das maiores dificuldades no isolamento de STEC é o uso de um método capaz de

detectar baixas concentrações, uma vez que as STEC, quando presentes nos alimentos, estão em baixos números (HUSSEIN; BOLLINGER, 2008).

5.5 Coliformes Termotolerantes

A maioria das amostras dos produtos cárneos (89,3%) estudados apresentou populações baixas de coliformes termotolerantes (< 10^2 NMP/g). Considerando que a legislação vigente estabelece limites de coliformes termotolerantes para lingüiça de $5x10^3$ NMP/g, para salsicha de 10^3 NMP/g e para coxa de frango de 10^4 NMP/g, e que as amostras analisadas eram cruas, comercializadas a granel ou moídas, os resultados permitem concluir que as condições higiênico-sanitárias na produção e comercialização da maioria das amostras foram satisfatórias. Segundo a Resolução RDC nº 12 de 2001 (ANVISA, 2001a), 4 (0,7%) das 552 amostras analisadas, três de lingüiça e uma de salsicha, seriam condenadas pela legislação pelo número elevado de coliformes termotolerantes. Entre essas amostras, as três de lingüiça foram também positivas para *Salmonella* spp.

Comparando os resultados do NMP/g para coliformes termotolerantes com os resultados de positividade para *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., verificou-se que a positividade para os patógenos foi maior nas amostras com maior número de coliformes termotolerantes. Essa correlação ficou mais evidente para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. do que *Campylobacter* spp. Entretanto, deve-se ressaltar que em 47,1% das amostras analisadas as contagens de coliformes termotolerantes foram inferiores a 3 NMP/g, mas nessas amostras havia positividade de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp, demonstrando que a ausência de bactérias indicadoras em produtos cárneos não significa ausência de patógenos.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste estudo, é possível concluir que:

- Dentre os patógenos estudados, *Listeria monocytogenes* foi o mais freqüente nos produtos analisados (48,7%), estando presente em 37,7% das amostras de salsicha bovina, 39,8% das de lingüiça suína, 59,4% das de carne moída e 58% das de coxa de frango.

- *Salmonella* spp. foi encontrada nas amostras de lingüiça (14,5%) e de coxa de frango (8,7%). Nenhuma das amostras de salsicha e de carne moída foi positiva para este patógeno.

- *Campylobacter* spp. foi encontrado nas amostras de carne moída (4,3%) e de coxa de frango (19,6%). Nenhuma das amostras de lingüiça e de salsicha foi positiva para este patógeno.

- Nenhuma das amostras analisadas foi positiva para *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC);

- As contagens de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. nas amostras positivas foram baixas. Em 86,6% das amostras positivas para *L. monocytogenes* e em todas as amostras positivas para *Salmonella* spp., as contagens destes microrganismos foram inferiores a 10^2 UFC/g e a 10^2 NMP/g, respectivamente. Em 84,4% das amostras positivas para *Salmonella* spp a contagem deste microrganismo foi inferior a 3 NMP/g.

- Entre as cepas de *L. monocytogenes* isoladas dos produtos analisados, houve uma diversidade de sorotipos, com predominância daquelas pertencentes ao Grupo 1 (sorotipos 1/2a e 3a). Em salsichas, houve prevalência de cepas de *L. monocytogene*s pertencentes ao Grupo 3 (sorotipos 1/2b, 3b e 7), enquanto

em lingüiças e coxas de frango também prevaleceram as cepas pertencentes ao do Grupo 1. Nas amostras de carne moída, as cepas de *L. monocytogene*s pertenceram a um grupo atípico, possivelmente do sorotipo 4b.

- Entre as cepas *Salmonellla* spp. isoladas dos produtos cárneos analisados, houve prevalência dos sorovares *S*. Typhimurium nas amostras de lingüiça e *S*. Enteritidis nas de coxa de frango.

- Os métodos de detecção foram mais sensíveis que os métodos de enumeração, tanto para *L. monocytogenes* quanto para *Salmonella* spp.

- A positividade para *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp foi maior nas amostras com maior número de coliformes termotolerantes.

- *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. são microrganismos patogênicos presentes nos produtos cárneos estudados comercializados no município de São Paulo, havendo um risco associado à eles. O risco que representam para a saúde da população dependerá das características do consumidor, do produto consumido, da quantidade ingerida e do patógeno presente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[2]

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001a**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=. Acesso em: 10 dez. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.13, de 02 de janeiro de 2001b**. Aprova o regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados e congelados. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1435&word=. Acesso em: 10 dez. 2010.

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D.L.; SILVEIRA, W.D.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.3, p.297-306, 2007.

ALBENONIS, J.M. **Bactérias do gênero *Listeria* em carne e água residuária de lavagem de carcaça de um matadouro frigorífico e em carne bovina moída comercializada na cidade de Goiânia, Goiás**. São Paulo, 1991. 144p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de São Paulo.

ALBERT, M.J.; FARUQUE, A.S.; FARUQUE, S.M.; SACK, R.B.; MAHALANABIS, D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.11, p.3458-3464, 1999.

ALLOS, B.M. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, n.8, p.1201-1206, 2001.

ALZAND, B.S.; ILHAN, M.; HEESEN, W.F.; MEEDER, J.G. *Campylobacter jejuni*: enterocolitis and myopericarditis. **International Journal of Cardiology**, 2010. [No Prelo]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19168238. Acesso em: 12 abril 2009.

AQUINO, M.H.; PACHECO, A.P.; FERREIRA, M.C.; TIBANA, A. Frequency of isolation and identification of thermophilic *Campylobacter*s from animals in Brazil. **Veterinary Journal**, v.164, n.2, p.159-161, 2002.

[2] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

AQUINO, M.H.C.; CARVALHO, J.; CARLOS, P.; TIBANA, A.; FRANCO, R.M. *Campylobacter jejuni*/coli: methodology of isolation and possible interfering factors in primary culture. **Journal of Food Protection**, v.59, p.429-432, 1996.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ARAGON, D.C.; MARTINEZ, E.Z.; LANDGRAF, M.; GOMBOSSY DE MELO FRANCO, B.D.; DESTRO, M.T. Performance of a chromogenic medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* in food. **Food Control**, v.19, n.5, p.483-486, 2008.

ARAÚJO, P.C.C. **Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados no município de Niterói**. Niterói, 1998. 90p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal Fluminense.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. Pecuária. **Pecuária Brasileira**. Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp. Acesso em: 2 abr. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUÇÃO E EXPORTAÇÃO DE CARNE SUÍNA. **Relatórios Anuais da Abipecs 2008.** São Paulo: ABIPECS, 2009. Disponível em: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/rela2008_P.pdf. Acesso em:15 maio 2009.

AUGUSTO FILHO, O. **Isolamento de *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos, comercializadas no município de Botucatu-SP**. Botucatu, 2001. 62p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

BALDASSI, L.; PIATTI, R.M.; ROJAS, M.V.R.; CALIL, E.M.B.; CASTRO, A.G.M. Prevalência de *Listeria* spp em amostras de carne de frango obtidas em abatedouros do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.19, n.130, p.81-84, 2005.

BARBALHO, T.C.F.; ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, v.16, n.3, p.21-26, 2005.

BARLOW, R.S.; GOBIUS, K.S.; DESMARCHELIER, P.M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: results of a one-year study. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, n.1, p.1-5, 2006.

BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; D'OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, n.4, p.591-596, 2007.

BAÚ, A.C.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.303-307, 2001.

BENEDUCE, L.; SPANO, G.; NABI, A.Q.; LAMACCHIA, F.; MASSA, S.; AOUNI, R.; HAMAMA, A. Occurrence and characterization of *Escherichia coli* O157 and other serotypes in raw meat products in Morocco. **Journal of Food Protection**, v.71, n.10, p.2082-2086, 2008.

BERGAMINI, A.M.M.; SIMÕES, M.; IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.553-556, 2007.

BERRANG, M.E.; BAILEY, J.S.; ALTEKRUSE, S.F.; SHAW, W.K.; PATEL, B.L.; MEINERSMANN, R.J.; FEDORKA-CRAY, P.J. Prevalence, serotype, and antimicrobial resistance of *Salmonella* on broiler carcasses postpick and postchill in 20 U.S. processing plants. **Journal of Food Protection**, v.72, n.8, p.1610-1615, 2009.

BESSA, M.C.; COSTA, M.D.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.2, p.80-84, 2004.

BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M.A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.11, p.2559-2564, 1989.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; DAHBI, G.; COIRA, M.A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.1, p.311-319, 2004.

BOHAYCHUK, V.M.; GENSLER, G.E.; KING, R.K.; MANNINEN, K.I.; SORENSEN, O.; WU, J.T.; STILES, M.E.; MCMULLEN, L.M. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. **Journal of Food Protection**, v.69, n.9, p.2176-2182, 2006.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, v.62, n.3, p.381-390, 2002.

BORGES, M.D.F.; SIQUEIRA, R.S.D.; BITTENCOURT, A.M.; VANETTI, M.C.D.; GOMIDE, L.A.M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.362-364, 1999.

BOROWSKY, L.M.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Estimation of most probable number of *Salmonella* in minced pork samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.544-546, 2007.

BOUGHTON, C.; LEONARD, F.C.; EGAN, J.; KELLY, G.; MAHONY, P.O.; MARKEY, B.K.; GRIFFIN, M. Prevalence and number of *Salmonella* in Irish retail pork sausages. **Journal of Food Protection**, v.67, p.1834-1839, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DTA.pdf. Acesso em: 2 mar. 2009.

BRUHN, J.B.; VOGEL, B.F.; GRAM, L. Bias in the *Listeria monocytogenes* Enrichment Procedure: Lineage 2 Strains Outcompete Lineage 1 Strains in University of Vermont Selective Enrichments. **Applied and Environmental Microbiology,** v.71, n.2, p.961-7, 2005.

BÜRK, C.; DIETRICH, R.; ACAR, G.; MORAVEK, M.; BÜLTE, M. MÄTLBAUER, E. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.5, p.2106-2112, 2003.

BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.10, p.868-876, 2004.

CABEDO, L.; PICART, I.; BARROT, L.; TEIXIDO, I.; CANELLES, A. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. **Journal of Food Protection**, v.71, n.4, p.855-859, 2008.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; BYRD, J.A.; NISBET, D.J. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. **Journal of Animal Science**, v.86, n.14, suppl., p.E163-E172, 2008.

CAPITA, R., ALVAREZ-ASTORGA, M.; ALONSO-CALLEJA, C.; MORENO, B.; DEL CAMINO GARCIA-FERNANDEZ, M. Occurrence of *salmonellae* in retail chicken carcasses and their products in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, n.2, p.169-173, 2003.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Comparison of different most-probable-number methods for enumeration of *Listeria* in poultry. **Journal of Food Protection**, v.66, n.1, p.65-71, 2003.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v.36, n.3, p.289-311, 2005.

CARMO, G.M.I.; OLIVEIRA, A.A.; DIMECH, C.P.; SANTOS, D.A.; ALMEIDA, M.G.; BERTO, L.H.; ALVES, R.M.S.; CARMO, E.H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde**, v.5, n.6, p.1-7, 2005. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf. Acesso em: 19 jul.2007.

CARVALHO, A.C.D.F.B.D.; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1465-1468, 2005.

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L. Contaminação de produtos avícolas industrializados e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp. **ARS Veterinária**, v.19, n.1, p.57-62, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***Salmonella* surveillance**: Annual summary, 2006. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2008. 101p. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/SalmonellaAnnualSummary2006.pdf. Acesso em: 11 jun. 2009.

CERQUEIRA, A.M.; GUTH, B.E.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.70, n.1/2, p.111-121, 1999.

CERQUEIRA, A.M.F.; TIBANA, A.; GUTH, B.E.C. High occurrence of shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.60, p.177-180, 1997.

CHEN, J.; ZHANG, X.; MEI, L.; JIANG, L.; FANG, W. Prevalence of Listeria in Chinese food products from 13 provinces between 2000 and 2007 and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.1, p.7-14, 2009.

CHIARINI, E.; TYLER, K.; FARBER, J.M.; PAGOTTO, F.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: manual and automatic evisceration. **Poultry Science**, v.88, n.4, p.791-797, 2009.

CHIU, C.H.; SU, L.H.; CHU, C. *Salmonella* enterica serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.2, p.311-322, 2004.

CHURCHILL, R.L.; LEE, H.; HALL, J.C. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. **Journal of Microbiological Methods**, v.64, n.2, p.141-170, 2006.

COKER, A.O.; ISOKPEHI, R.D.; THOMAS, B.N.; AMISU, K.O.; OBI, C.L. Human *Campylobacter*iosis in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.3, p.237-244, 2002.

CORNU, M.; KALMOKOFF, M.; FLANDROIS, J. P. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. **International Journal of Food Microbiology,** v.73, n.2-3, p.261- 74, 2002.

CORTEZ, A.L.; CARVALHO, A.C.; SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; VIDAL-MARTINS, A.M.; BURGER, K.P. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.6, p.307-310, 2006.

CORTEZ, A.L.L. **Indicadores de qualidade higiênico-sanitária em lingüiça frescal comercializada no município de Jaboticabal, SP**. Jaboticabal, 2003. 42p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

COSTA, F.N. **Sorotipos de "*Salmonella*" em carcaças e cortes de frango obtidos na indústria e no comércio e comportamento das cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos**. Jaboticabal, 1996. 72p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

COUTINHO, L.C.M. **Parâmetros de qualidade de corte de carne bovina resfriada comercializada na cidade do Rio de Janeiro**. 2004. 57p. Dissertação de Mestrado - Vigilância Sanitária - Fundação Oswaldo Cruz, 2004.

CRUSHELL, E.; HARTY, S.; SHARIF, F.; BOURKE, B. Enteric *Campylobacter*: purging its secrets? **Pediatric Research**, v.55, n.1, p.3-12, 2004.

CURI, J.D.P. **Condições microbiológicas de lanches (cachorro quente) adquiridos de vendedores ambulantes, localizados na parte central da cidade de Limeira – SP**. Piracicaba, 2006. 109p. Dissertação de Mestrado - Ciência e Tecnologia de Alimentos - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R., eds. **Food microbiology**: fundamentals and frontiers. 3.ed. Washington: ASM Press, 2007. p.187–236.

DE CESARE, A.; MIONI, R.; MANFREDA, G. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in fresh and fermented Italian sausages and ribotyping of contaminating strains. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, n.1/2, p.124-130, 2007.

DENNY, J.; MCLAUCHLIN, J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe - an opportunity for improved European surveillance. **Eurosurveillance**, v.13, n.13, 2008. Disponível em: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8082. Acesso em: 19 jan. 2008.

DELHALLE, L.; SAEGERMAN, C.; FARNIR, F.; KORSAK, N.; MAES, D.; MESSENS, W.; DE SADELEER, L.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G. *Salmonella* surveillance and control at post-harvest in the Belgian pork meat chain. **Food Microbiology**, v.26, n.3, p.265-271, 2009.

DESTRO, M.T.; DE MELO SERRANO, A.; KABUKI, D.Y. Isolation of Listeria species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v.2, n.2, p.110-112, 1991.

DIAS, T.C.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; PERES, J.N. Chicken carcasses as a source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.32, n.6, p.414-418, 1990.

DOMÍNGUEZ, A.; TORNER, N.; RUIZ, L.; MARTINEZ A.; BARTOLOME, R.; SULLEIRO, E.; TEIXIDO, A.; PLASENCIA, A. Foodborne *Salmonella*-caused outbreaks in Catalonia (Spain), 1990 to 2003. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, Jan, p.209-213, 2007.

DONNELLY, C.W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, v.59, n.6, p.183-194, 2001.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.8, p.3819-3822, 2004.

EFFLER, E.; ISAACSON, M.; ARNTZEN, L.; HEENAN, R.; CANTER, P.; BARRETT, T.; LEE, L.; MAMBO, C.; LEVINE, W.; ZAIDI, A.; GRIFFIN, P.M. Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.5, p.812-819, 2001.

ERICKSON, M.C.; DOYLE, M.P. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v.70, n.10, p.2426-2449, 2007.

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

ESREY, S.A.; FEACHEM, R.G. **Interventions for the control of diarrhoel bases among young children promotion of food hygiene**. Geneva: World Health Organization, 1989. 21p. (WHO/CDD/89.30).

ETHELBERG, S.; OLSEN, K.E.; SCHEUTZ, F.; JENSEN, C.; SCHIELLERUP, P.; ENBERG, J.; PETERSEN, A.M.; OLESEN, B.; GERNER-SMIDT, P.; MOLBAK, K. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.5, p.842-847, 2004.

FANTELLI, K.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, n.1/2, p.63-69, 2001.

FARAH, S. M.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; IRINO, K.; DA SILVA, L. R.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B.; PIGATTO, C. P.; FADEL-PICHETH, C. M. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Parana State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology,** v. 44, n. 6, p. 607-612, 2007.

FARMER III, J.J.; MCWHORTER, A.C.; MORRIS, G.K.; BRENNER, D.J. The *Salmonella*-Arizona group of Enterobacteriaceae: nomenclature, classification, and reporting. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.6, n.9, p.63-66, 1984.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; DIAS, A.M.; ALMEIDA, I.A.; MELO, L.C. *Salmonella* serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.4, p.179-184, 2006.

FILIOUSIS, G.; JOHANSSON, A.; FREY, J.; PERRETEN, V. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. **Food Control**, v.20, n.3, p.314-317, 2009.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, v.86, n.14 suppl, p.E173-E187, 2008.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M.; NAYAK, R. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. **Journal of Animal Science**, v.86, n.14, suppl, p.E149-E162, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Food quality and safety systems**: a training manual on Food Hygiene and the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) System. Rome: FAO, 1998. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/W8088E/w8088e00.htm. Acesso em: 14 maio 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety risk analysis**: a guide for national food safety authorities. Rome: FAO, 2006. (FAO Food and Nutrition Paper, 87). Disponível em: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0822e/a0822e00.pdf. Acesso em: 15 jun. 2008.

FRANCHIN, P.R.; AIDOO, K.E.; BATISTA, C.R.V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, n.2, p.157-162, 2005.

FRANCHIN, P.R.; OGLIARI, P.J.; BATISTA, C.R. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. **British Poultry Science**, v.48, n.2, p.127-132, 2007.

FRIEDMAN, C.; NEIMANN, J.; WEGENER, H.; TAUXE, R. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrializated nations. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M., ed. ***Campylobacter***. 2.ed. Washington: ASM Press, 2000. p.121-138.

FUZIHARA, T.O.; FERNANDES, S.A.; FRANCO, B.D. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v.63, n.12, p.1749-1753, 2000.

GALANIS, E.; LO FO WONG, D.M.; PATRICK, M.E.; BINSZTEIN, N.; CIESLIK, A.; CHALERMCHIKIT, T.; AIDARA-KANE, A.; ELLIS, A.; ANGULO, F.J.; WEGENER, H.C. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.3, p.381-388, 2006.

GEIMBA, M.P.; TONDO, E.C.; DE OLIVEIRA, F.A.; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v.67, n.6, p.1229-1233, 2004.

GERNER-SMIDT, P.; WHICHARD, J.M. Foodborne disease trends and reports. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, n.1, p.1-4, 2007.

GHAFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G. A seven-year survey of *Campylobacter* contamination in meat at different production stages in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, n.1, p.111-120, 2007.

GIRALDI, R.; GUTH, B.E.; TRABULSI, L.R. Production of Shiga-like toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in Sao Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.6, p.1460-1462, 1990.

GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.; DE VALK, H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.5, p.734-740, 2008.

GRADEL, K.O.; NIELSEN, H.L.; SCHONHEYDER, H.C.; EJLERTSEN, T.; KRISTENSEN, B.; NIELSEN, H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after *Salmonella* or *Campylobacter* gastroenteritis. **Gastroenterology**, v.137, n.2, p.495-501, 2009.

GREIG, J.D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, n.2, p.77-87, 2009.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**. 9.ed. Paris: Institut Pasteur, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 2007. 166p. Disponível em: http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_2007.pdf. Acesso em: 05 abril 2009.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M.L.; GUSTAVSSON, P.; THORKELSSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A.M.; NICLASEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, v.21, n.2, p.217-225, 2004.

GUNTHER, N.W.T.; CHEN, C.Y. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. **Food Microbiology**, v.26, n.1, p.44-51, 2009.

GUTH, B.E.; LOPES DE SOUZA, R.; VAZ, T.M.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.5, p.535-536, 2002.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v.85, n.13, suppl, p.E45-E62, 2007.

HELMS, M.; SIMONSEN, J.; MOLBAK, K. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, n.4, p.498-506, 2006.

HOFER, C.B.; MELLES, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, p.375-377, 1999.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; OLIVEIRA, M.A. *Listeria monocytogenes* meningitis: case reports in patients from the Federal District. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.2, p.173-177, 1998.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.D.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.32-37, 2006.

HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.5, p.615-620, 2000.

HONG, J.; KIM, J.M.; JUNG, W.K.; KIM, S.H.; BAE, W.; KOO, H.C.; GIL, J.; KIM, M.; SER, J.; PARK, Y.H. Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat, pork, and beef in Korea, from 2001 to 2006. **Journal of Food Protection**, v.70, n.4, p.860-866, 2007.

HORROCKS, S.M.; ANDERSON, R.C.; NISBET, D.J.; RICKE, S.C. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and coli in animals. **Anaerobe**, v.15, n.1/2, p.18-25, 2009.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I.A.; O'BRIEN, S.J. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Food Control**, v.18, n.7, p.766-772, 2007.

HUMPHREY, T.; MASON, M.; MARTIN, K. The isolation of *Campylobacter jejuni* from contaminated surfaces and its survival in diluents. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, n.3, p.295-303, 1995.

HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacter*s as zoonotic pathogens: a food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, n.3, p.237-257, 2007.

HUSSEIN, H.S.; BOLLINGER, L.M. Influence of selective media on successful detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food, fecal, and environmental samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.5, n.3, p.227-244, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cidades. São Paulo, SP. Infográficos. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm. Acesso em: 12 dez 2009.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbiological testing in food safety management**. New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2002. 362p. (Micro-organisms in foods, 7).

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbial ecology of food commodities**. 2.ed. New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2005. 736p. (Microorganisms in foods, 6).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10272-1**: microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Switzerland: ISO, 2006. 16 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11290-1**: microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method: modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. Switzerland: ISO, 2004. 16p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11290-2:1998**: microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method. Switzerland: ISO, 1998. 19p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579:2002**: microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Switzerland: ISO, 2002. 20p.

IRINO, K.; VAZ, T.M.; KATO, M.A.; NAVES, Z.V.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.; ROCHA, M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.; GUTH, B.E. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in Sao Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.4, p.446-447, 2002.

IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; MEDEIROS, M.I.C.; KATO, M.A.M.F.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C. Serotype diversity as a drawback in the surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, n.4, p.565-567, 2007.

JACKSON, P.J.M.; NEILL, J.N.R.; O´BREIN, D.B.A.; HOLMES, K.R.; NEWLAND, W.J. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiology Letter**, v.44, n.1, p.109-114, 1987.

JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994-1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.47-51, 1999.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.25, n.2, p.571-580, 2006.

JERSE, A.E.; KAPER, J.B. The eae gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infection and Immunity**, v.59, n.12, p.4302-4309, 1991.

KABUKI, D.Y. **Contagem de *Listeria* spp. pelo método do número mais provável (NMP)**: avaliação da sua ocorrência em carnes de frango e da eficiência de sanitizantes na redução da contaminação por L. *monocytogenes*. Campinas, 1997. 100p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.2, p.123-140, 2004.

KARAKOLEV, R. Incidence of *Listeria monocytogenes* in beef, pork, raw-dried and raw-smoked sausages in Bulgaria. **Food Control**, v.20, n.10, p.953-955, 2009.

KARMALI, M.A.; GANNON, V.; SARGEANT, J.M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, 2009. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19410388. Acesso: 2 jun. 2009.

KARMALI, M.A.; MASCARENHAS, M.; SHEN, S.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, S.; REID-SMITH, R.; ISAAC-RENTON, J.; CLARK, C.; RAHN, K.; KAPER, J.B. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.11, p.4930-4940, 2003.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.18, n.3, p.775-779, 1977.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. cap.8, p.69-80.

KUBOTA, K.; IWASAKI, E.; INAGAKI, S.; NOKUBO, T.; SAKURAI, Y.; KOMATSU, M.; TOYOFUKU, H.; KASUGA, F.; ANGULO, F.J.; MORIKAWA, K. The human health burden of foodborne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyagi Prefecture, Japan. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.5, n.5, p.641-648, 2008.

LAGE, M.E. **Ocorrência de *Listeria* spp. em carne de frango no mercado da cidade de Belo Horizonte, MG**. Belo Horizonte, 1993. 78p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal De Minas Gerais.

LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M.; KIRSCHBAUM, C.R.A.; MARCHI, C.R. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.63-67, 1999.

LEE, G.Y.; JANG, H.I.; HWANG, I.G.; RHEE, M.S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v.134, n.3, p.196-200, 2009.

LEMES-MARQUES, E.G.; CRUZ, C.D.; DESTRO, M.T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.287-292, 2007.

LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, B.E.; IRINO, K.; VETTORATO, M.P.; ONUMA, D.L.; DE CASTRO, A.F. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.97, n.1/2, p.103-109, 2003.

LIANOU, A.; SOFOS, J.N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p.2172-2198, 2007.

LITTLE, C.L.; RICHARDSON, J.F.; OWEN, R.J.; PINNA, E.; THRELFALL, E.J. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005. **Food Microbiolology**, v.25, n.3, p.538-543, 2008.

LO FO WONG, D.M.A.; HALD, T.; VAN DER WOLF, P.J.; SWANENBURG, M. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Production Science**, v.76, n.3, p.215-222, 2002.

LUIZ, A.D.F.; MOREIRA, F.C.; CORRÊA, E.D.F.; FALCÃO, D.P. Monitoring of the dissemination of *Salmonella* in the chicken Frankfurt-sausage productionline of a sausage factory in the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.477-480, 2004.

MAINIL, J.G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.6, p.1332-1344, 2005.

MANFREDA, G.; MIONI, R.; FORNASIERO, E.; CESARE, A.; FRANCHINI, A. Prevalence and characterisation of populations of *Listeria monocytogenes* during sausage ripening. **Veterinary Research Communications**, v.31, suppl.1, p.377-379, 2007.

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

MARQUES, S.C.; BOARI, C.A.; BRCKO, C.C.; NASCIMENTO, A.R.; PICCOLI, R.H. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.1120-1123, 2006.

MARTINS, L.L.; SANTOS, I.F.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; BEZZ, J. Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas em embalagens a vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói, RJ/Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.67, n.3, p.215-220, 2008.

MATHEUS, D.P.; RUDGE, A.C.; GOMES, S.M.M. Ocorrência de *Salmonella* spp em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.2, p.111-115, 2003.

MAYRHOFER, S.; PAULSEN, P.; SMULDERS, F.J.; HILBERT, F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, n.1, p.23-29, 2004.

MEAD, P.S.; DUNNE, E.F.; GRAVES, L.; WIEDMANN, M.; PATRICK, M.; HUNTER, S.; SALEHI, E.; MOSTASHARI, F.; CRAIG, A.; MSHAR, P.; BANNERMAN, T.; SAUDERS, B.D.; HAYES, P.; DEWITT, W.; SPARLING, P.; GRIFFIN, P.; MORSE, D.; SLUTSKER, L.; SWAMINATHAN, B. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. **Epidemiology and Infection**, v.134, n.4, p.744-751, 2006.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n.5, p.607-625, 1999.

MEDEIROS, D.T.; SATTAR, S.A.; FARBER, J.M.; CARRILLO, C.D. Occurrence of *Campylobacter* spp. in raw and ready-to-eat foods and in a Canadian food service operation. **Journal of Food Protection**, v.71, n.10, p.2087-2093, 2008.

MELDRUM, R.J.; GRIFFITHS, J.K.; SMITH, R.M.; EVANS, M.R. The seasonality of human campylobacter infection and *Campylobacter* isolates from fresh, retail chicken in Wales. **Epidemiology and Infection**, v.133, n.1, p.49-52, 2005.

MELONI, D.; GALLUZZO, P.; MUREDDU, A.; PIRAS, F.; GRIFFITHS, M.; MAZZETTE, R. *Listeria monocytogenes* in RTE foods marketed in Italy: prevalence and automated EcoRI ribotyping of the isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v.129, n.2, p.166-173, 2009.

MELTON-CELSA, A.R.; DARNELL, S.C.; O'BRIEN, A.D. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. **Infection and Immunity**, v.64, n.5, p.1569-1576, 1996.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, v.21, n.2, p.213-216, 2004.

MENA, C.; RODRIGUES, D.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Occurrence, identification, and characterization of *Campylobacter* species isolated from portuguese poultry samples collected from retail establishments. **Poultry Science**, v.87, n.1, p.187-190, 2008.

MENG, J.H.; FENG, P.; DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. In DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.35, p.331-342.

MIRANDA, J.M.; MONDRAG, A.C.N.; MARTINEZ, B.; GUARDDON, M.; RODRIGUEZ, J.A. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. **Journal of Food Protection**, v.72, n.5, p.966-971, 2009.

MIYASAKI, K.N., CHIARINI, E.; SANT´ANA, A.D.S.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.D.M. High prevalence, low counts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in linguiça, a Brazilian fresh pork sausage. **Meat Science**, v.83, n.3, p.523-527, 2009.

MOORE, J.E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J.S.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; MCDOWELL, D.A.; MEGRAUD, F.; MILLAR, B.C.; O'MAHONY, R.; O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J.R.; ROONEY, P.J.; SAILS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v.36, n.3, p.351-382, 2005.

MUCH, P.; PICHLER, J.; KASPER, S.S.; ALLERBERGER, F. Foodborne outbreaks, Austria 2007. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v.121, n.3/4, p.77-85, 2009.

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

MURPHY, C.; CARROLL, C.; JORDAN, K.N. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, n.4, p.623-632, 2006.

NACHAMKIN, I. Chronic effects of Campylobacter infection. **Microbes and Infection**, v.4, n.4, p.399-403, 2002.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.47-51, 2004.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NØRRUNG, B. Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, n.3, p.217-221, 2000.

O'BRIEN, A.D.; LAVECK, G.D.; THOMPSON, M.R.; FORMAL, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v.146, n.6, p.763-769, 1982.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos.** Curso de sensibilização. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2008. 160 p.

OTEIZA, J.M.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; RIVAS, M. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). **Food Microbiology**, v.23, n.3, p.283-288, 2006.

PADUNGTON, P.; KANEENE, J.B. *Campylobacter* spp in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, n.2, p.161-170, 2003.

PATON, A.W.; PATON, J.C. Detection and characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.2, p.598-602, 1998a.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.3, p.450-479, 1998b.

PELISSER, M.R.; MENDES, S.D.C.; SUTHERLAND, A.D.; BATISTA, C.R.V. Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using Clearviewtm and a modified conventional culture method. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.113-116, 2001.

PERELLE, S.; DILASSER, F.; GROUT, J.; FACH, P. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, n.3, p.284-288, 2007.

PESSOA, G.V.A.; SILVA, E.A.M. Milieu pour l'identification présomptive rapide dês entérobactéries, dês *Aeromonas* et dês vibrions. **Annales de Microbiologie**, v.125A, p.341-347, 1974.

PETTINATI, N.N.; TELLES, E.O.; BALIAN, S.C. *Listeria monocytogenes* in hot dog sausage obteined from groceries stores in the city of São Paulo - a comparative and retrospective analysis of human listeriosis isolations. **Veterinária e Zootecnia**, v.13, p.182-191, 2006.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, n.3, p.281-287, 2003.

PIÉRARD, D.; MUYLDERMANS, G.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.11, p.3317-3322,1998.

PINHEIRO, M.S. ***Campylobacter* biotipos termofilicos em carcacas de frango e avaliação da metodologia de isolamento de C. *jejuni* e *C. coli***. Rio de Janeiro, 1991. 144p. Dissertação de Mestrado – Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1991.

PLYM-FORSHELL, L.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.25, n.2, p.541-554, 2006.

POLY, F.; GUERRY, P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.24, n.1, p.27-31, 2008.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2001 (no.45) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v.154, n.3, p.173-174, 2003.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, 1997. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars**. 7.ed. Paris: Institut Pasteur, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 1997. 4p.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L.E. The genus *Salmonella.* In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: Springer, 2005. v.2, p.764-799.

POSFAY-BARBE, K.M.; WALD, E.R. Listeriosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v.14, n.4, p.228-233, 2009.

PRAAKLE-AMIN, K.; HANNINEN, M.L.; KORKEALA, H. Prevalence and genetic characterization of *Listeria monocytogenes* in retail broiler meat in Estonia. **Journal of Food Protection**, v.69, n.2, p.436-440, 2006.

PRADO, J.V.; CAVAGNARO, S.M.F. Síndrome hemolítico urémico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos: aspectos clínicos y epidemiológicos. **Revista Chilena de Infectología**, v.25, p.435-444, 2008.

PRENDERGAST, D.M.; DUGGAN, S.J.; FANNING, S.; CORMICAN, M.; GONZALES-BARRON, U.; BUTLER, F.; DUFFY, G. Prevalence and numbers of *Salmonella* spp. and Enterobacteriaceae on pork cuts in abattoirs in the Republic of Ireland. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, n.4, p.1209-1219, 2008.

RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V.M.; REJITHA, J.S.; LEKSHMI, M.U.; DHARSANA, K.S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H.M. *Listeria*: review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.40, n.1, p.4-13, 2007.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; GODARD, C.; WILDEMAUWE, C.; PASTUSZCZAK-FRAK, M.; DE ZUTTER, L. Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. **Journal of Food Protection**, v.71, n.1, p.146-152, 2008.

REITER, M.G.; BUENO, C.M.; LOPEZ, C.; JORDANO, R. Occurrence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v.68, n.9, p.1903-1906, 2005.

REITER, M.G.; FIORESE, M.L.; MORETTO, G.; LOPEZ, M.C.; JORDANO, R. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v.70, n.7, p.1723-1725, 2007.

RHOADES, J.R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella* enterica and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. **Food Microbiology**, v.26, n.4, p.357-376, 2009.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.D.; BESSA, M.C.; NASCIMENTO, V.P.D. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.296-299, 2007.

RIGOBELO, E.C.; GAMEZ, H.J.; MARIN, J.M.; MACEDO, C.; AMBROSIN, J.A.; ÁVILA, F.A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.305-310, 2006.

RIGOBELO, E.C.; SANTO, E.; MARIN, J.M. Beef carcass contamination by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in an abattoir in Brazil: characterization and resistance to antimicrobial drugs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.5, n.6, p.811-816, 2008.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v.308, n.12, p.681-685, 1983.

RISTORI, C.A.; BERGAMINI, A.M.M.; ROWLANDS, R.E.G.; LOPES, G.I.S.L.; PAULA, A.M.R.; OLIVEIRA, M.A.; RIBEIRO, E.G.A.; TORRE, J.C.M.D.; PRADO, S.P.T.; YOSHIDA, J.T.U.; RODRIGUES, R.S.M.; TAHA, O.G.; MASIGLIA, D.A.P.; JAKABI, M. Quantificação de *Salmonella* spp. e avaliação dos dizeres de rotulagem de carcaças de frango congeladas comercializadas no Estado de São Paulo. **BEPA, Boletim Epidemiológico Paulista**, v.52, p.16-19, 2008.

RISTORI, C.A.; ROWLANDS, R.E.G.; JAKABI, M.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C.; IRINO, K. Pesquisa de *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (STEC) em amostras de carne crua moída comercializadas no município de São Paulo. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v.16, n.1, p.12-13, 2006.

RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; ROLDÃN, C.D.; BALBI, L.; GARCÃA, B.; FIORILLI, G.; SOSA-ESTANI, S.; KINCAID, J.; RANGEL, J.; GRIFFIN, P.M. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.1, p.88-96, 2006.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, n.3, p.197-209, 2000.

RODOLPHO, D.; MARIN, J.M. Isolation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* from butcheries in Taquaritinga city, State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.599-602, 2007.

RODRIGUES, K.L.; GOMES, J.P.; CONCEIÇÃO, R.D.C.D.S.D.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.447-452, 2003.

ROLLINS, D.M.; COLWELL, R.R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, n.3, p.531-538, 1986.

RUSSO, T.A.; JOHNSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, n.5, p.1753-1754, 2000.

SÁ, I.V.A.D.; SOLARI, C.A. *Salmonella* in Brazilian and imported pet reptiles. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.293-297, 2001.

SAITOH, T.; IYODA, S.; YAMAMOTO, S.; LU, Y.; SHIMUTA, K.; OHNISHI, M.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H. Transcription of the ehx Enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.14, p.4822-4830, 2008.

SAKATE, R.I.; ARAGON, L.C.; RAGHIANTE, F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.; DESTRO, M.T. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in pre-sliced vacuum-packaged. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.53, n.2, p.184-187, 2003.

SAKUMA, H.; FRANCO, B.D.G.M.; FERNANDEZ, H. Occurence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in retail raw chicken meat and giblets in São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia***,* v.23, p.13-16, 1992.

SALLAM, K.I. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan. **Food Control**, v.18, n.9, p.1113-1120, 2007.

SALVATORI, R.U.; BESSA, M.C.; CARDOSO, M.R.D.I. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto Alegre-RS. **Ciência Rural**, v.33, p.771-773, 2003.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis**: a molecular approach. Washington: ASM Press, 1994. 418p.

SAMPERS, I.; HABIB, I.; DE ZUTTER, L.; DUMOULIN, A.; UYTTENDAELE, M. Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, n.2/3, p.147-153, 2010.

SANTOS, D.M.S.; BERCHIERI Jr., A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A.D. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.1, p.39-42, 2000.

SANTOS, L.A.G.; TEODORO, V.; MONTEIRO, L.L.; GUIMARÃES, K.R.; PINTO, P.S.A.; BEVILACQUA, P.D. Listeriose transmissível por produtos de origem animal. **Higiene Alimentar**, v.18, n.124, p.35-42, 2004.

SANTOS, R.F.C.; VIANA, M.S.R.; NOVAES, R.M.P.; NASCIMENTO, J.S. *E. coli* O157:H: estudo de um caso ocorrido no Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, v.21, p.377-378, 2007.

SCHERER, K.; BARTELT, E.; SOMMERFELD, C.; HILDEBRANDT, G. Quantification of *Campylobacter* on the surface and in the muscle of chicken legs at retail. **Journal of Food Protection**, v.69, n.4, p.757-761, 2006.

SCHLECH, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v.308, n.4, p.203-206, 1983.

SCHLUNDT, J. New directions in foodborne disease prevention. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, n.1/2, p.3-17, 2002.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, v.63, n.3, p.1055-1061, 1995.

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L.H.; KARCH, H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1205-1208, 2000.

SCHMITT, C.K.; MCKEE, M.L.; O'BRIEN, A.D. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. **Infection and Immunity**, v.59, n.3, p.1065-1073, 1991.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, p.501-505, 2003.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.2959-2965, 2004.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétricas para as ciências do comportamento**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1975. 350p.

SILVA, M.C.C. **Ocorrência de *Listeria* spp. em embutidos cárneos artesanais comercializados no mercado varejista da cidade de contagem, MG**. Belo Horizonte, 1996. 76p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais.

SILVA, M.C.D.; FARIA, G.S.; PAULA, D.A.J.D.; MARTINS, R.P.; CARAMORI Jr., J.G.; KICH, J.D.; COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**, v.39, p.266-268, 2009.

SILVA, W.P.D.; LIMA, A.S.D.; GANDRA, E.Á.; ARAÚJO, M.R.D.; MACEDO, M.R.P.D.; DUVAL, E.H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, p.911-916, 2004.

SIMPSON BEAUCHAMP, C., BYELASHOV, O.A.; GEORNARAS, I.; KENDALL, P.A.; SCANGA, J.A.; BELK, K.E.; SMITH, G.C.; SOFOS, J.N. Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing, thawing and home storage of frankfurters. **Food Microbiology**, v.27, n.1, p.144-149, 2010.

SOUZA, R.L.; NISHIMURAB, L.S.; GUTH, B.E.C. Uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O165:HNM as cause of hemolytic uremic syndrome in São Paulo, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.59, p.223-225, 2007.

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**, v.28, p.779-785, 2008.

STRAVER, J.M.; JANSSEN, A.F.; LINNEMANN, A.R.; VAN BOEKEL, M.A.; BEUMER, R.R.; ZWIETERING, M.H. Number of *Salmonella* on chicken breast filet at retail level and its implications for public health risk. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p.2045-2055, 2007.

SUZUKI, H.; YAMAMOTO, S. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in the world: a literature survey. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.71, n.3, p.255-261, 2009.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v.9, n.10, p.1236-1243, 2007.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microrganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.5, p.53-62.

SWITT, A.I.; SOYER, Y.; WARNICK, L.D.; WIEDMANN, M. Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella* enterica serotype 4,5,12:i. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.4, p.407-415, 2009.

TAREMI, M.; DALLAL, M.S.; GACHKAR, L.; MOEZARDALAN, S.; ZOLFAGHARIAN, K.; ZALI, M.R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef meat, Tehran, Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.3, p.401-403, 2006.

TARR, P.I.; GORDON, C.A.; CHANDLER, W.L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **Lancet**, v.365, n.9464, p.1073-1086, 2005.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.5, p.315-322, 1996.

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; PERESI, J.T.; FUZIHARA, T.O.; YONAMINE, E.K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v.65, n.6, p.1041-1044, 2002.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z.; LUCIANO, R.L.; CASTRO, A.G.M.D. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, p.2557-2560, 2008.

THEVENOT, D.; DERNBURG, A.; VERNOZY-ROZAND, C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, n.1, p.7-17, 2006.

TIMM, C.D.; IRINO, K.; GOMES, T.A.; VIEIRA, M.M.; GUTH, B.E.; VAZ, T.M.; MOREIRA, C.N.; ALEIXO, J.A. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Letter in Applied Microbiology**, v.44, n.4, p.419-425, 2007.

TIROLLI, I.C.C.; COSTA, C.A.D. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. **Acta Amazonica**, v.36, p.205-208, 2006.

TOYOSHIMA, M.T.K.; APANAVICIUS, A.; SOEIRO, A.D.M.; ALMEIDA, G.M.D.D.; ARAI, M.H. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, p.291-293, 2006.

TRACHOO, N.; FRANK, J.F.; STERN, N.J. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. **Journal of Food Protection**, v.65, n.7, p.1110-1116, 2002.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. UBA Relatórios Anuais. **Relatório anual 2007/2008**. Disponível em: http://www.uba.org.br. Acesso em: 22 maio 2008.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.1139-1145, 2006.

VAN ASTEN, A.J.; VAN DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.44, n.3, p.251-259, 2005.

VASCONCELOS, R.M.D.; ALMEIDA, A.E.C.C.D.; HOFER, E.; SILVA, N.M.M.D.; MARIN, V.A. Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.836-838, 2008.

VASILEV, V.; JAPHETH, R.; ANDORN, N.; YSHAI, R.; AGMON, V.; GAZIT, E.; KASHI, Y.; COHEN, D. A survey of laboratory-confirmed isolates of invasive listeriosis in Israel, 1997-2007. **Epidemiology and Infection**, v.137, n.4, p.577-580, 2009.

VAZ, T.M.; IRINO, K.; KATO, M.A.; DIAS, A.M.; GOMES, T.A.; MEDEIROS, M.I.; ROCHA, M.M.; GUTH, B.E. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.2, p.903-905, 2004.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GONZALEZ-ZORN, B.; KREFT, J.; GOEBEL, W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and Infection**, v.3, n.7, p.571-584, 2001.

VESSONI, C.L.Z. **Resistência a antimicrobianos em cepas de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp isoladas de carcaças de frango**. Campinas, 2004. 100p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

VINDIGNI, S.M.; SRIJAN, A.; WONGSTITWILAIROONG, B.; MARCUS, R.; MEEK, J.; RILEY, P.L.; MASON, C. Prevalence of foodborne microorganisms in retail foods in Thailand. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, n.2, p.208-215, 2007.

VITAS, A.I.; GARCIA-JALON, V.A. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v.90, n.3, p.349-356, 2004.

VON LAER, A.E.; LIMA, A.S.; TRINDADE, P.S.; SILVA, W.P. Monitoramento de *Listeria monocytogenes* em planta de processamento de lingüiça mista frescal localizada em Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**, v.1, n.3, p.192-198, 2005.

WEINSTEIN, D.L.; JACKSON, M.P.; SAMUEL, J.E.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. **Journal of Bacteriology**, v.170, n.9, p.4223-4230, 1988.

WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; WACHSMUTH, I.K.; RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G.K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.3, p.512-520, 1983.

WONG, T.L.; HOLLIS, L.; CORNELIUS, A.; NICOL, C.; COOK, R.; HUDSON, J.A. Prevalence, numbers, and subtypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in uncooked retail meat samples. **Journal of Food Protection**, v.70, n.3, p.566-573, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Disease Control.** Interin Report, 1994. Geneva, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness**. 2007. (Fact sheet, n.237). Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html. Acesso em: 12 abr. 2007.

YOUNG, K.T.; DAVIS, L.M.; DiRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.9, p.665-679, 2007.

YÜCEL, N.; ÇITAK, S.; ÖNDER, 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.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1441-1446, 2002.

ZHAO, C.; BEILEI, G.; DE VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D.G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, Turkey, pork, and beef from the greater Washington, D.C., area. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.12, p.5431-5436, 2001.

ZHOU, X.; JIAO, X. Prevalence and lineages of *Listeria monocytogenes* in Chinese food products. **Letters in Applied Microbiology**, v.43, n.5, p.554-559, 2006.

ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; WREN, B.W.; BAJAJ-ELLIOTT, M. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, n.2, p.123-129, 2008.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo