

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**



Dissertação

***Salmonella* spp. em cortes cárneos provenientes de açougues do sul do
Rio Grande do Sul**

Abílio Vaz Gonçalves

Pelotas, 2016

Abílio Vaz Gonçalves

***Salmonella* spp. em cortes cárneos provenientes de açougues do sul do
Rio Grande do Sul**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eduarda Hallal Duval

Co-orientador: Prof. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G635s Gonçalves, Abílio Vaz

Salmonella spp. em cortes cárneos provenientes de açougues do sul do Rio Grande do Sul / Abílio Vaz Gonçalves ; Eduarda Hallal Duval, orientador. — Pelotas, 2016.

56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Açougues. 2. Virulência. 3. Resistência a antimicrobianos. I. Duval, Eduarda Hallal, orient. II. Título.

CDD : 664

Abílio Vaz Gonçalves

***Salmonella* spp. em cortes cárneos provenientes de açougues do sul do
Rio Grande do Sul**

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 30/05/2016

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Eduarda Hallal Duval – UFPel (Orientadora)

Prof. Dr. Eliézer Ávila Gandra – UFPel

Prof. Dr^a. Natacha Deboni Cereser - UFPel

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm - UFPel

Dedico este trabalho a meus pais, Fideles e Rozimeri, ao meu irmão Afonso, a minha avó Ana e, em especial, a minha noiva Renata.

Agradecimentos

A Deus por me dar coragem para não esmorecer, sabedoria e força para concretizar este trabalho.

A minha família em especial aos meus pais Fideles e Rozimeri, e ao meu irmão pelo incentivo para ultrapassar os obstáculos, e juntos nos tornarmos pessoas melhores. A minha avó que sempre esteve junto comigo torcendo e rezando para que tudo desse certo.

A minha noiva Renata, que sempre esteve ao meu lado com muita paciência e palavras de apoio e carinho, me fazendo encarar a vida de uma maneira melhor.

A Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, que permitiu a realização deste trabalho, e à Capes, pela concessão da bolsa de estudo.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Eduarda Hallal Duval, pela oportunidade e confiança, amizade e ensinamentos durante o período de orientação.

A Prof^a. Dr^a. Élen Silveira Nalério, pelos ensinamentos, convívio e amizade e a todos os amigos da Embrapa Pecuária Sul.

Aos meus amigos e colegas Gabriel, Roger e Louise pela amizade e dedicação com que me auxiliaram durante o experimento.

Aos amigos e professores do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, por terem me acolhido e auxiliado.

Aos amigos e professores do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial, ao amigo Cláudio, que sempre esteve ao meu lado e proporcionou inúmeras risadas e boas lembranças.

Aos amigos de Bagé, que me apoiaram, em especial ao Pedro e o casal de amigos Rafael e Caroline, com que compartilhei inseguranças e risadas.

E a todos aqueles que, de alguma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho, ou ao menos torceram para que ele desse certo.

Muito Obrigado!

Resumo

GONÇALVES, Abílio Vaz. ***Salmonella* spp. em cortes cárneos provenientes de açougues do sul do Rio Grande do Sul.** 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Os açougues representam cerca de 20-25% do faturamento de um supermercado no Brasil. Durante seu processamento, os cortes cárneos estão sujeitos a contaminação por micro-organismos patogênicos como *Samonella* spp. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *Salmonella* spp. em balanças de pesagem e cortes cárneos comercializados em açougues de supermercados na região sul do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil. Avaliou-se a presença de *Salmonella* spp. em amostras de superfícies de dianteiros, cortes dos balcões de atendimento e autoatendimento, carne moída e superfície de balanças de pesagem. Os isolados encontrados foram identificados molecularmente como *Salmonella* spp. e, posteriormente foram analisados quanto à presença de genes de virulência. Também foi realizada análise fenotípica e molecular para avaliar a resistência dos isolados de *Salmonella* a antimicrobianos. Foram encontrados 14 isolados de *Salmonella* spp nas amostras de dianteiros, cortes do balcão de atendimento e autoatendimento e carne moída. Os genes *hila* e *invA* foram confirmados em todos os isolados de *Salmonella* spp.. Já os genes *sefA* e *pefA* foram identificados em apenas dois isolados, e o gene *spvC* em doze isolados. Foi verificada a resistência ao ácido nalidíxico e sulfonamidas em doze isolados, de *Salmonella* spp. Apenas três isolados apresentaram o gene de resistência a antimicrobianos *sul1*. Os demais genes de resistência testados não foram detectados. Pode-se verificar que houve presença de *Salmonella* spp., em 9,72% (14/144) amostras avaliadas, observando resistência antimicrobiana em alguns dos isolados encontrados.

Palavras-chave: açougues, virulência, resistência a antimicrobianos.

Abstract

GONÇALVES, Abílio Vaz. ***Salmonella* spp. in meat cuts originating from butcher shops in southern Rio Grande do Sul.** 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Butcher shops represent about 20 to 25% of the annual income of supermarkets in Brazil. During processing, meat cuts are subject to contamination by pathogenic microorganisms such as *Salmonella* spp. This study aims to evaluate the presence of *Salmonella* spp. in weighing scales as well as in meat cuts sold in supermarket butcher shops in southern Rio Grande do Sul state, Brazil. The presence of *Salmonella* spp. in samples from surfaces of blade clods cuts from counters and self-service counters, ground beef and weighing scales surfaces was evaluated. The isolated found were molecularly identified as *Salmonella* spp. and later on were analyzed for the presence of virulence genes. Also, molecular and phenotypic analyzes was performed to evaluate the resistance of the isolated from *Salmonella* to antimicrobials. Fourteen isolated from *Salmonella* spp. were found in the samples of blade clods, counter and self-service, and also ground beef. The genes *hlyA* and *invA* were confirmed in all the isolated of *Salmonella* spp. Yet, the *sefA* and *pefA* genes were identified in only two isolated and the *spvC* gene in twelve isolated. The resistance to nalidixic acid as well as sulphonamides was verified in twelve isolated from *Salmonella* spp. Only three isolated showed the gene for resistance to sul1 antimicrobials. The other resistance genes tested were not detected. The presence of *Salmonella* spp was found in 9,72% (14/144) of the evaluated samples as well as antimicrobial resistance in some of the isolated found.

Key words: butcher shops, virulence, resistance to antimicrobials.

Lista de Figuras

Figura 1: Produtos de PCR para confirmação do gene <i>hilA</i>	24
Figura 2: Produtos de PCR para confirmação do gene <i>invA</i>	24
Figura 3: Produtos de PCR para confirmação do gene <i>sefA</i>	25
Figura 4: Produtos de PCR para confirmação do gene <i>pefA</i>	25
Figura 5: Produtos de PCR para confirmação do gene <i>spvC</i>	26
Figura 6: Produtos de PCR para confirmação do gene <i>sul1</i>	27

Lista de Tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos usados na detecção do gene <i>hlyA</i> para confirmação do gênero <i>Salmonella</i> spp. nos isolados e dos genes <i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>sefA</i> e <i>pefA</i> para identificação dos genes devirulência.....	22
Tabela 2: Oligonucleotídeos usados para detecção de genes de resistência a antimicrobianos nos isolados de <i>Salmonella</i> spp.	23
Tabela 3: Avaliação da resistência dos isolados de <i>Salmonella</i> spp., frente aos antimicrobianos.....	27

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. Artigo.....	16
3.1. Introdução.....	18
3.2. Materiais e Métodos.....	19
3.2.1. Coleta de Amostras.....	19
3.2.1.1. Amostras de dianteiros.....	20
3.2.1.2. Amostras de cortes cárneos.....	20
3.2.1.3. Amostras das balanças.....	20
3.2.2. Análises Microbiológicas.....	20
3.2.2.1. Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.....	20
3.2.3. Confirmação molecular e identificação dos genes de virulência no isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	21
3.2.4. Perfil de resistência dos isolados de <i>Salmonella</i> spp. frente a antimicrobianos.....	22
3.2.5 Detecção dos genes de resistência a antimicrobianos.....	23
3.3. Resultados.....	23
3.3.1. Análises microbiológicas.....	23

3.3.2. Confirmação molecular dos isolados de <i>Salmonella</i> spp. e detecção dos genes de virulência.....	24
3.3.3. Perfil de resistência a antimicrobianos.....	26
3.3.4. Avaliação dos genes de resistência.....	27
3.4. Discussão.....	28
3.5. Conclusão.....	32
3.6 Referências.....	32
4. Considerações finais.....	44
5. Referências bibliográficas.....	45

1. Introdução

O Brasil é um dos maiores exportadores de carne bovina do mundo, e possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo (BRASIL, 2015; CNA, 2015). Programas de incentivo ao aumento da produtividade, sanidade animal e segurança de alimentos têm possibilitado ao país oferecer carne de qualidade, capaz de atender qualquer exigência do mercado externo e também do seu próprio mercado consumidor (ABIEC, 2015).

O supermercado é responsável pela intermediação entre a indústria e o consumidor final, através da negociação de produtos e serviços de uso pessoal ou familiar, que atendam às necessidades de seus clientes. O comércio varejista de alimentos é predominantemente realizado na forma de autosserviço, ou seja, os produtos são disponibilizados de maneira acessível para os clientes, sendo escolhidos sem a influência de vendedores (SUPERHUPER, 2014; AGAS, 2015).

Os açougues são um tipo de comércio varejista de alimentos que comercializam carne *in natura* e outros produtos de origem animal sob várias formas de apresentação tais como: resfriados, congelados, produtos salgados e defumados, embalados à vácuo ou embalados em bandejas. A venda de cortes cárneos representa cerca de 20-25% do faturamento total de supermercados no Brasil, tornando-se imprescindível a atenção para o setor, a fim de que sejam oferecidos produtos diferenciados, que atendam às necessidades do consumidor (FIESP, 2014; ABRAS, 2015).

Os açougues desempenham um papel importante na distribuição e comercialização de cortes cárneos, possíveis falhas durante o processo podem reduzir a vida de prateleira e aumentar a contaminação dos cortes. (OLIVEIRA et al., 2008). A falta de higiene nos equipamentos, instalações precárias, bem como práticas inadequadas, contribuem para a ocorrência de doenças alimentares. Porém, com programas de segurança de alimentos e treinamento dos colaboradores, pode-se reduzir a contaminação dos utensílios e dos manipuladores, obtendo-se assim alimentos seguros ao consumidor (SOARES et al. 2013).

Em açougues de supermercados e demais lojas do varejo, os dianteiros, ap serem recebidos, são armazenados em câmaras frias sob temperatura de até 7°C, onde são mantidos até o momento do processamento. Posteriormente, são expostos para venda ao consumidor em forma de cortes cárneos, em balcões de atendimento

e autoatendimento, ambos com temperatura controlada de até 7°C (RIO GRANDE DO SUL, 2009).

Conforme MORELLI et al. (2012), nos açougues dos supermercados e demais lojas do varejo, são utilizados balcões refrigerados que permanecem abertos durante a exposição dos produtos cárneos para os consumidores, o que pode provocar a elevação da temperatura destes cortes, desde o seu acondicionamento até o momento da venda. Os cortes cárneos devem ser posicionados corretamente nos balcões a fim de evitar obstruções no fluxo de frio, mantendo a temperatura recomendada (RIO GRANDE DO SUL, 2009). As embalagens mais utilizadas nestes balcões são as bandejas de poliestireno, onde os cortes são colocados e envoltos com filmes plásticos, melhorando a apresentação (SARANTÓPOULOS et al., 2001).

A carne é considerada um alimento de alto valor nutritivo para o ser humano, já que representa uma fonte de proteínas, nutrientes, vitaminas, entre outros (MOTTA et al., 2000). O consumo de carne bovina é um hábito consolidado no Brasil e vem aumentando cada vez mais. O país é o quarto maior consumidor per capita, com consumo médio de 37 quilos por pessoa/ano, atrás dos Estados Unidos, Argentina e Uruguai (ABIEC, 2015). A elevada atividade de água e o pH próximo da neutralidade, dentre outros fatores, tornam a carne um excelente meio para a proliferação de micro-organismos. Estes fatores, quando não controlados, podem causar prejuízos tanto de ordem econômica quanto à saúde do consumidor (FERREIRA & SIMM, 2012). Com isso a carne está sujeita à contaminação em todas as etapas de sua produção, desde o abate, armazenamento, distribuição, até o preparo doméstico (HOBBS & ROBERTS, 1999; MINIHAN et al., 2003; PARDI et al., 2006). Cortes cárneos comercializados em açougues de supermercados devem estar livres de micro-organismos patogênicos, o que torna indispensável a adoção de boas práticas de fabricação (BPF) durante o seu processamento a fim de garantir a sua qualidade higiênico-sanitária (WHEELER, NALCHAYANAND, BOSILEVAC, 2014).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) representam um grave problema à saúde pública, tendo sérias consequências econômicas. A qualidade microbiológica dos alimentos está condicionada, primeiro, à quantidade e ao tipo de micro-organismos inicialmente presentes e depois à multiplicação destes micro-organismos no alimento (HOFFMANN, 2001; SNYDMAN, 2002). *Salmonella* spp. é micro-organismo patogênico que contamina com frequência produtos de origem animal,

como os cortes cárneos (GILL, 1998; ABBASSI-GHOZZI et al., 2012). No Brasil este patógeno é o mais associado a surtos de DTA (BRASIL, 2015^a), porém, na grande maioria, são ignorados. Dentre aqueles notificados, os cortes cárneos bovinos estão entre os seis alimentos mais envolvidos (FAO, 2002; WHO, 2007).

As bactérias do gênero *Salmonella* spp. são importantes causadoras de infecção alimentar, sendo comumente veiculada por produtos de origem animal (STEVENS et al., 2008). O gênero *Salmonella* spp. contém muitos sorovares de acordo com os antígenos somático, flagelar e capsular. São conhecidos aproximadamente 2500 sorovares diferentes (POPOFF et al., 2003). O DNA de vários sorotipos de *Salmonella* já foi sequenciado, com isso, já é conhecida a grande maioria dos genes e suas funções. Alguns deles são necessários à sobrevivência da bactéria, outros podem auxiliar na competição com outros micro-organismos, auxiliando na invasão e sobrevivência na célula do hospedeiro, resistência a antimicrobianos (LANGRIDGE, 2009).

A confirmação do gênero *Salmonella* spp. pode ocorrer com a utilização de genes que estão presentes em todos sorovares do patógeno, outros genes que codificam proteínas para invasão, expressão de fímbrias, internalização e multiplicação nas células do hospedeiro (MADIGAN et al., 2010).

O surgimento de cepas resistentes a antimicrobianos pode ser devido ao uso incorreto de antimicrobianos em animais e humanos. Com isso torna-se necessária a vigilância continua em relação ao perfil de resistência a antimicrobianos de micro-organismos isolados de carne bovina (SKOV et al., 2007; GRAZIANI et al., 2008).

No Brasil, o uso profilático de antimicrobianos é proibido de acordo com as Instruções Normativas nº 9/2003 e nº 11/2004 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2004). Em condições naturais, a conjugação é o mecanismo de transferência mais comum, sendo este o processo no qual o contato entre as células é estabelecido e um poro é formado na parede bacteriana, para que ocorra a passagem de DNA da célula doadora para a receptora. A transferência horizontal dos elementos genéticos contribui para aquisição e disseminação de genes a resistência a antimicrobianos (VANHOEK et al., 2011; DOMINGUES et al., 2012).

A identificação de patógenos durante o processamento dos cortes cárneos, fornecerá informações sobre a contaminação, auxiliando os supermercados para que possam corrigir possíveis gargalos, reduzindo a contaminação dos cortes cárneos que

são oferecidos aos consumidores. Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em cortes de carne bovina comercializados em açougues de supermercados, através de técnicas fenotípicas e moleculares, além de verificar a presença de genes de virulência e perfil de resistência a antimicrobianos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em cortes de carne bovina comercializados em açougues de supermercados da região sul do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar fenotipicamente e molecularmente isolados de *Salmonella* spp. em cortes de carne bovina.
- Verificar a presença de genes de virulência nos isolados encontrados
- Verificar fenotipicamente a resistência dos isolados de *Salmonella* spp. encontrados, frente aos antimicrobianos;
- Verificar a presença de genes de resistência aos antimicrobianos nos isolados de *Salmonella* spp. encontrados.

3. Artigo

***Salmonella* spp. em cortes cárneos provenientes de açougues do sul do Rio Grande do Sul**

Resumo

Os cortes cárneos representam cerca de 20-25% do faturamento de um supermercado no Brasil. Durante seu processamento, os cortes cárneos estão sujeitos a contaminação por micro-organismos patogênicos como *Samonella* spp. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *Salmonella* spp. em balanças de pesagem e cortes cárneos comercializados em açougues de supermercados na região sul do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil. Avaliou-se a presença de *Salmonella* spp. em amostras de superfícies de dianteiros, cortes dos balcões de atendimento e autoatendimento, carne moída e superfície de balanças de pesagem. Os isolados encontrados foram identificados molecularmente como *Salmonella* spp. e, posteriormente foram analisados quanto à presença de genes de virulência. Também foi realizada análise fenotípica e molecular para avaliar a resistência dos isolados de *Salmonella* a antimicrobianos. Foram encontrados 14 isolados de *Salmonella* spp nas amostras de dianteiros, cortes do balcão de atendimento e autoatendimento e carne moída. Os genes *hilA* e *invA* foram confirmados em todos isolados de *Salmonella* spp.. Já os genes *sefA* e *pefA* foram identificados em apenas dois isolados, e o gene *spvC* em doze isolados. Foi verificada a resistência ao ácido nalidíxico e sulfonamidas em doze isolados, de *Salmonella* spp. Apenas três isolados apresentaram o gene de resistência a antimicrobianos *sul1*. Os demais genes de resistência testados não foram detectados. Pode-se verificar que houve presença de *Salmonella* spp., em 9,72% (14/144) amostras avaliadas, onde alguns dos isolados obteve-se resistência a antimicrobianos.

Palavras-chave: açougues, virulência, resistência a antimicrobianos.

Abstract

GONÇALVES, Abílio Vaz. ***Salmonella* spp. in meat cuts originating from butcher shops in southern Rio Grande do Sul.** 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Butcher shops represent about 20 to 25% of the annual income of supermarkets in Brazil. During processing, meat cuts are subject to contamination by pathogenic microorganisms such as *Salmonella* spp. This study aims to evaluate the presence of *Salmonella* spp. in weighing scales as well as in meat cuts sold in supermarket butcher shops in southern Rio Grande do Sul state, Brazil. The presence of *Salmonella* spp. in samples from surfaces of blade clods cuts from counters and self-service counters, ground beef and weighing scales surfaces was evaluated. The isolated found were molecularly identified as *Salmonella* spp. and later on were analyzed for the presence of virulence genes. Also, molecular and phenotypic analyzes was performed to evaluate the resistance of the isolated from *Salmonella* to antimicrobials. Fourteen isolated from *Salmonella* spp. were found in the samples of blade clods, counter and self-service, and also ground beef. The genes *hlyA* and *invA* were confirmed in all the isolated of *Salmonella* spp. Yet, the *sefA* and *pefA* genes were identified in only two isolated and the *spvC* gene in twelve isolated. The resistance to nalidixic acid as well as sulphonamides was verified in twelve isolated from *Salmonella* spp. Only three isolated showed the gene for resistance to *sul1* antimicrobials. The other resistance genes tested were not detected. The presence of *Salmonella* spp was found in 9,72% (14/144) of the evaluated samples as well as antimicrobial resistance in some of the isolated found.

Key words: butcher shops, virulence, resistance to antimicrobials.

3.1. Introdução

O Brasil é um dos maiores exportadores de carne bovina do mundo, e possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo (BRASIL, 2015; CNA, 2015). Programas de incentivo ao aumento da produtividade, sanidade animal e segurança de alimentos têm possibilitado ao país oferecer carne de qualidade, sendo capaz de atender qualquer exigência do mercado externo e também do seu próprio mercado consumidor (ABIEC, 2015).

A venda de cortes cárneos representa cerca de 20-25% do faturamento total de supermercados no Brasil, tornando-se imprescindível a atenção a este setor (PIGATTO et al., 2003; ABRAS, 2015). Em açougues de supermercados e demais lojas do varejo, os dianteiros, após serem recebidos, são armazenados em câmaras frias sob temperatura de até 7°C, onde são mantidos até o momento do processamento. Posteriormente, são expostos para venda ao consumidor em forma de cortes cárneos, em balcões de atendimento e autoatendimento, ambos com temperatura controlada de até 7°C (RIO GRANDE DO SUL, 2009).

Nos balcões de atendimento, os cortes são expostos em bandejas plásticas e/ou pendurados em grandes volumes. Já nos balcões de autoatendimento, os cortes são expostos fracionados em bandejas de poliestireno envoltos com filmes plásticos que atuam como barreiras, evitando possíveis fontes de contaminação aumentando a durabilidade dos cortes (SARANTÓPOULOS et al., 2001), assim como a carne moída proveniente de recortes dos dianteiros e do preparo dos cortes. Estes cortes, dispostos em balcões refrigerados, devem ser corretamente posicionados, a fim de evitar obstruções no fluxo de frio, mantendo a temperatura adequada. De forma errada, em alguns casos, estes balcões permanecem abertos durante a exposição dos produtos cárneos aos consumidores, o que pode provocar a elevação da temperatura dos cortes, desde o seu acondicionamento até o momento da venda (MORELLI et al., 2012).

A carne está sujeita à contaminação em todas as etapas de sua produção, desde o abate, armazenamento, distribuição, até o preparo doméstico (HOBBS & ROBERTS, 1999; MINIHAN et al., 2003; PARDI et al., 2006). Cortes cárneos comercializados devem estar livres de micro-organismos patogênicos, o que torna

indispensável a adoção de boas práticas de fabricação (BPF) durante o processamento, a fim de garantir a qualidade higiênico-sanitária dos produtos oferecidos ao consumidor (JAY, 1996; WHEELER, 2014).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) representam um grave problema à saúde pública, tendo sérias consequências econômicas. A qualidade microbiológica dos alimentos está condicionada, primeiro, a quantidade e ao tipo de micro-organismos inicialmente presentes, e depois, a capacidade de multiplicação destes no alimento (HOFFMANN, 2001; SNYDMAN, 2002). *Salmonella* spp. é um micro-organismos patogênicos que contamina com frequência produtos de origem animal, como os cortes cárneos (ABBASSI-GHOZZI et al., 2012). No Brasil este patógeno é o mais associado a surtos de DTA (BRASIL, 2015^a), porém, na grande maioria, são ignorados. Dentre os surtos notificados, os cortes cárneos bovinos estão entre os seis alimentos mais envolvidos (FAO, 2002; WHO, 2007).

O surgimento de cepas resistentes a antimicrobianos pode ser devido ao uso incorreto de antimicrobianos em animais e humanos, tornando-se necessária a vigilância continua em relação ao perfil de resistência a antimicrobianos de micro-organismos (SKOV et al., 2007; GRAZIANI et al., 2008). Em função do aumento de micro-organismos resistentes, é de grande importância a investigação da presença de genes de resistência (HABING et al., 2012). Este fato ocasiona um grave problema na saúde pública, visto que, reduz a eficiência dos tratamentos (POPOWSKA et al., 2012). No Brasil, o uso profilático de antimicrobianos é proibido de acordo com as Instruções Normativas nº 9/2003 e nº 11/2004 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2004).

Objetivou-se, no presente estudo, pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em cortes de carne bovina comercializados em açougues de supermercados, através de técnicas fenotípicas e moleculares, além de verificar a presença de genes de virulência e perfil de resistência a antimicrobianos.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Coleta de amostras

De abril de 2014 a abril de 2015, foram realizadas quatro coletas em quatro açougues de supermercados localizados na região Sul do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, totalizando dezesseis coletas. Foram amostradas superfícies de dianteiros

bovinos (n = 32), cortes de carne bovina do balcão de atendimento (n = 32) e de autoatendimento (n = 32), e carne bovina moída (n = 32). Além disso, em todas as coletas foram realizadas a amostragem da superfície da balança (n = 16) utilizada nos açougues para a pesagem dos cortes cárneos.

Todas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) para a realização das análises microbiológicas.

3.2.1.1. Amostras de dianteiros

A superfície dos dianteiros foi amostrada através de suabes esterilizados em quatro pontos de 25 cm² cada, sendo face medial do pescoço, face medial da costela, face lateral da paleta e face lateral do peito, totalizando uma região de 100 cm² por dianteiro amostrado. Os suabes foram mantidos em água peptonada tamponada (MicroMed®), para posterior pesquisa de *Salmonella* spp.

3.2.1.2. Amostras de cortes cárneos

As amostras de cortes cárneos do balcão de atendimento e do autoatendimento, bem como as amostras de carne moída, foram coletadas nas embalagens em que são comercializadas e mantidas em refrigeração até o momento das análises.

3.2.1.3. Amostras das balanças

A superfície das balanças foi amostrada através de suabes esterilizados em quatro pontos de 25 cm² cada, totalizando 100 cm², os quais foram mantidos em água peptonada tamponada (MicroMed®), para posterior pesquisa de *Salmonella* spp.

3.2.2. Análises microbiológicas

3.2.2.1. Isolamento de *Salmonella* spp.

As amostras foram inicialmente submetidas a um pré-enriquecimento em Água Peptonada Tamponada (MicroMed®) a 37°C por 24 hs, seguido de enriquecimento

seletivo nos caldos Rappaport Vassiliadis (MicroMed®) e Tetratonato suplementado com iodo e verde brilhante (MicroMed®) a 41°C por 24 hs. De cada um dos meios de enriquecimento, foi transferida uma alçada para placas contendo ágar Xilose Lisina Desoxicolato (Synth®) e ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (Synth®) as quais foram incubadas a 37°C por 24hs. Colônias típicas foram submetidas aos testes bioquímicos em ágar Lisina Ferro (Acumedia®), Ágar Tríplice Açúcar Ferro (Acumedia®) e Caldo Ureia (Synth®). Aquelas que apresentaram características típicas de *Salmonella* spp. foram submetidas ao teste sorológico, utilizando Soro Polivalente (Probac®), para a confirmação do patógeno (FDA, 2009).

3.2.3 Confirmação molecular e identificação dos genes de virulência nos isolados de *Salmonella* spp.

Todos isolados identificados bioquimicamente como *Salmonella* spp. foram repicados para Caldo Brain Heart Infusion (Himedia®), incubados 37° por 24 horas para posterior extração do DNA utilizando a técnica de pérolas de vidro, de acordo com o protocolo proposto por Green e Sambrook (2012), com adaptações. Posteriormente, o DNA foi quantificado por espectrofotometria (Jenway®), diluído em água ultrapura estéril até a concentração de 10 ng.µL⁻¹ e mantido a -20° C.

Os isolados de *Salmonella* spp. foram submetidos à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação do gene *hila*, específico para *Salmonella* spp. (CRACUINAS et al., 2012). Para cada reação, foram adicionados 12,5 µL de 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µL de cada *primer forward* e *reverse* a 10 pmol, 2 µL de DNA (10ng) e 8,5 µL de água ultrapura para completar o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador (MJ Research PTC 100) a 94°C por 4 min, para a desnaturação inicial do DNA e, posteriormente, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 63°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e 72°C por 10 minutos para a extensão final. Os produtos das PCR foram submetidos a eletroforese a 80V por 70 min em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (solução de Tris, ácido bórico e EDTA) 0,5X, utilizando-se o marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen®). O produto amplificado foi corado com GelRed™ e visualizado sob luz UV em transiluminador (Loccus®, L-PixTouch).

A presença de genes de virulência também foi avaliada através da técnica de PCR. Para cada reação, foram adicionados 12,5 µL de 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µL de cada *primer* a 10 pmol, 2 µL de DNA (10ng) e 8,5 µL de água ultrapura para completar o volume final de 25 µL. Os genes pesquisados foram *invA*, *sefA*, *pefA* e *spvC*, sendo as condições de cada reação realizadas seguindo os protocolos dos autores citados na Tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos usados na detecção do gene *hila* para confirmação do gênero *Salmonella* spp. nos isolados e dos genes *invA*, *spvC*, *sefA* e *pefA* para identificação dos genes de virulência.

Genes alvo	Sequência dos <i>Primers</i> (5'-3')	Produto (pb)	Referências
<i>hila</i>	fw: GCGAGATTGTGAGTAAAAACACC rv: CTGCCCCGGAGATATAATAATCG	413	Crăciunas <i>et al.</i> (2012)
<i>invA</i>	fw: TTGTTACGGCTATTTTGACCA rv: CTGACTGCTACCTTGCTGATG	521	Swamy <i>et al.</i> (1996)
<i>spvC</i>	fw: CGGAAATACCATCTACAAATA rv: CCCAAACCCATACTTACTCTG	669	Swamy <i>et al.</i> (1996)
<i>sefA</i>	fw: GCAGCGGTTACTATTGCAGC rv: TGTGACAGGGACATTTAGCG	330	Woodward and Kirwan (1996)
<i>pefA</i>	fw: TTCCATTATTGCACTGGGTG rv: AAGCCACTGCGAAAGATGCC	497	Haneda <i>et al.</i> (2001)

fw: *primer forward*; rv: *primer reverse*.

3.2.4 Perfil de resistência dos isolados de *Salmonella* spp. frente a antimicrobianos.

Foi utilizada a técnica de difusão em ágar (CLSI, 2006), utilizando ágar Mueller-Hinton (MH, Merck®). Foram testados 8 antimicrobianos, sendo ácido Nalidixico (NAL, 30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 10 µg), cefotaxime (CFO, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), cloranfenicol (COL, 30 µg), estreptomicina (STR, 10 µg), sulfonamidas (SUL, 300 µg). A classificação dos isolados como resistente, intermediário ou susceptível foi realizada de acordo com CLSI (2006). A multirresistência foi definida quando o isolado apresentou resistência a dois ou mais agentes antimicrobianos. Foi utilizada *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 como cepa controle.

3.2.5. Detecção dos genes de resistência a antimicrobianos

Os isolados que apresentaram perfil de resistência a antimicrobianos, foram submetidos a detecção de genes através da técnica de PCR para classe dos β -lactâmicos (*blaZ*), inibidores da síntese do folato (*sul1* e *sul2*) e aminoglicosídeos (*strA* e *strB*), de acordo com os protocolos propostos pelos autores citados na Tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos usados para detecção de genes de resistência a antimicrobianos nos isolados de *Salmonella* spp.

Agentes Antimicrobianos	Gene alvo	Sequência dos <i>Primers</i> (5'-3')	Produto (pb)	Referências
β -lactâmicos	<i>blaZ</i>	fw: ACTTCAACACCTGCTGCTTTC rv: TGACCACTTTTATCAGCAACC	172	Martineau et al. (2000)
Inibidores da Síntese do Folato	<i>sul1</i>	fw: ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTG rv: CTAGGCATGATCTAACCCTCGGTCT	840	Grape et al. (2003)
	<i>sul2</i>	fw: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT rv: GCGTTTGATACCGGCACCCGT	293	Kern et al. (2002)
Aminoglicosídeos	<i>strA</i>	fw: TGA CTGGTTGCCTGTCAGAGG rv: CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGCA	645	Kehrenberg and Schwarz (2001)
	<i>strB</i>	fw: ATCGTCAAGGGATTGAAACC rv: GGATCGTAGAACATATTGGC	510	Kikuvu et al. (2001)

fw: primer forward; rv: primer reverse.

3.3. Resultados

3.3.1. Análises microbiológicas

Houve presença de *Salmonella* spp. em 3,12% (1/32) das amostras de superfícies de dianteiros, 12,5% (4/32) das amostras de cortes cárneos do balcão de atendimento, 6,25% (2/32) das amostras de cortes cárneos do balcão de autoatendimento e em 21,87% (7/32) das amostras de carne moída, obtendo-se 14 isolados. Não houve presença do patógeno nas superfícies das balanças de pesagem.

3.3.2. Confirmação molecular dos isolados de *Salmonella* spp. e detecção dos genes de virulência.

Todos os 14 isolados foram submetidos à PCR para detecção do gene *hila*, específico para *Salmonella* spp, apresentando o produto esperado de 413 pb, confirmando o gênero (Figura 1). Em relação aos genes de virulência, 100% dos isolados portavam o gene *invA* (Figura 2).

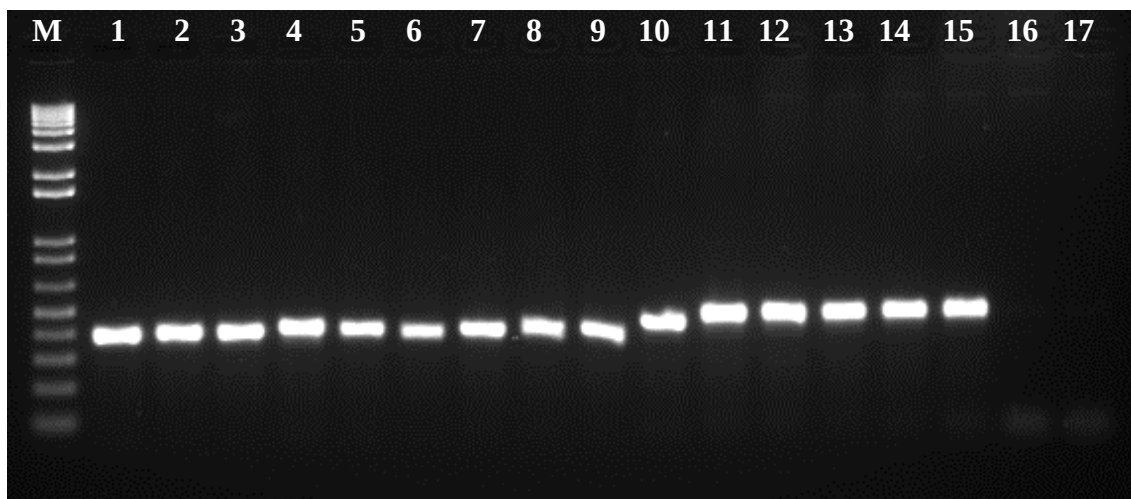


Figura 1- Produtos de PCR para confirmação da presença do gene *hila* (413 pb). 1-14 isolados *Salmonella* spp.; 15 Controle positivo: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; 16: Controle negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922; 17: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).

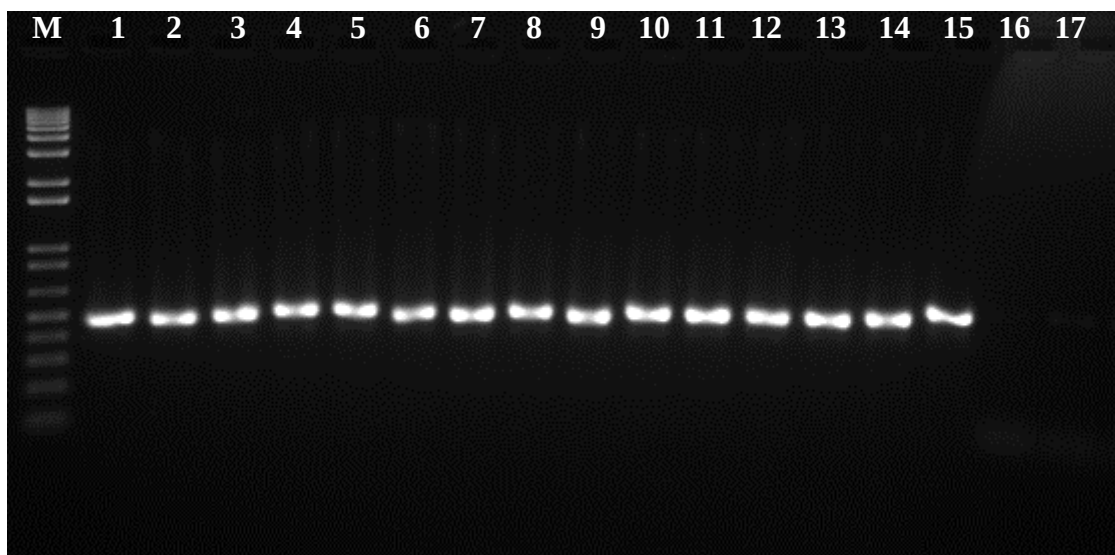


Figura 2- Produtos de PCR para confirmação da presença do gene *invA* (521pb). 1-14 isolados de *Salmonella* spp.: 15 Controle positivo: *Salmonella* Enteritidis ATCC

13076; 16: Controle negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922; 17: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).

Em relação a presença dos genes *sefA* (Figura 3) e *pefA* (Figura 4), ambos foram encontrados em apenas 2 dos isolados testados, sendo estes provenientes de carne moída.



Figura 3- Produtos de PCR para confirmação da presença do gene *sefA* (330pb). 1-14 isolados de *Salmonella* spp..15 Controle positivo: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; 16:Controle negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922; 17: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



Figura 4- Produtos de PCR para confirmação da presença do gene *pefA* (497pb). 1-14 isolados de *Salmonella* spp..15 Controle positivo: *Salmonella* Enteritidis ATCC

13076; 16: Controle negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922; 17: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).

Já em relação a presença do gene *spvC*, este foi encontrado em 12 isolados, sendo estes provenientes de dianteiros bovinos, cortes do balcão de atendimento, balcão de autoatendimento e carne moída (Figura 5)

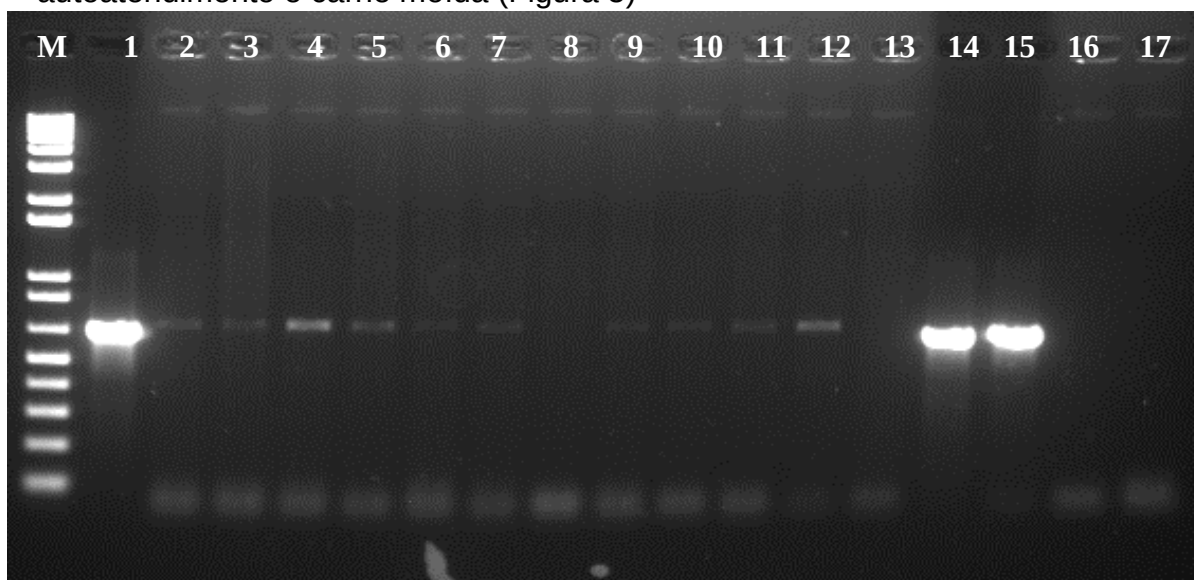


Figura 5- Confirmação da presença do gene *spvC* (669pb). 1-14 isolados de *Salmonella* spp. 15: Controle positivo: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; 16: Controle negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922; 17: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).

3.3.3. Perfil de resistência a antimicrobianos

Com relação ao perfil de resistência a antimicrobianos, 85,7% (12/14) dos isolados de *Salmonella* spp. apresentaram resistência a sulfonamidas e ácido nalidíxico, 78,5% (11/14) ao cloranfenicol, 50% (7/14) a estreptomicina, 45,8%(6/14) a amoxicilina e ao ácido clavulânico, 35,7% (5/14) a cefotaxima e 7,1% (1/14) a ceftazidima. Em relação a ciprofloxacina, 100% (14/14) dos isolados apresentaram susceptibilidade.

Tabela 3: Avaliação da resistência dos isolados de *Salmonella* spp., frente aos antimicrobianos.

Antimicrobianos	Perfil de resistência (%)		
	Susceptível	Intermediário	Resistente
AMC	39,9	14,3	45,8
SUL	14,3	0	85,7
NAL	14,3	0	85,7
CAZ	85,8	7,1	7,1
CTX	50	14,3	35,7
CIP	100	0	0
EST	28,5	21,5	50
CLO	21,5	0	78,5

3.3.4. Avaliação dos genes de resistência

Dentre os 6 isolados de *Salmonella* spp. que apresentaram resistência a amoxicilina (β -lactâmicos), nenhum deles apresentou o gene *blaZ*. Nos 12 isolados de *Salmonella* spp. resistentes as sulfonamidas, foi detectada a presença do gene *sul1* em 25% deles (3/14) (Figura 6), não sendo verificada a presença do gene *sul2* nos isolados testados. Já nos sete isolados de *Salmonella* spp. resistentes a estreptomicina (aminoglicosídeos) não foi verificada a presença dos genes *strA* e *strB* nos isolados testados.

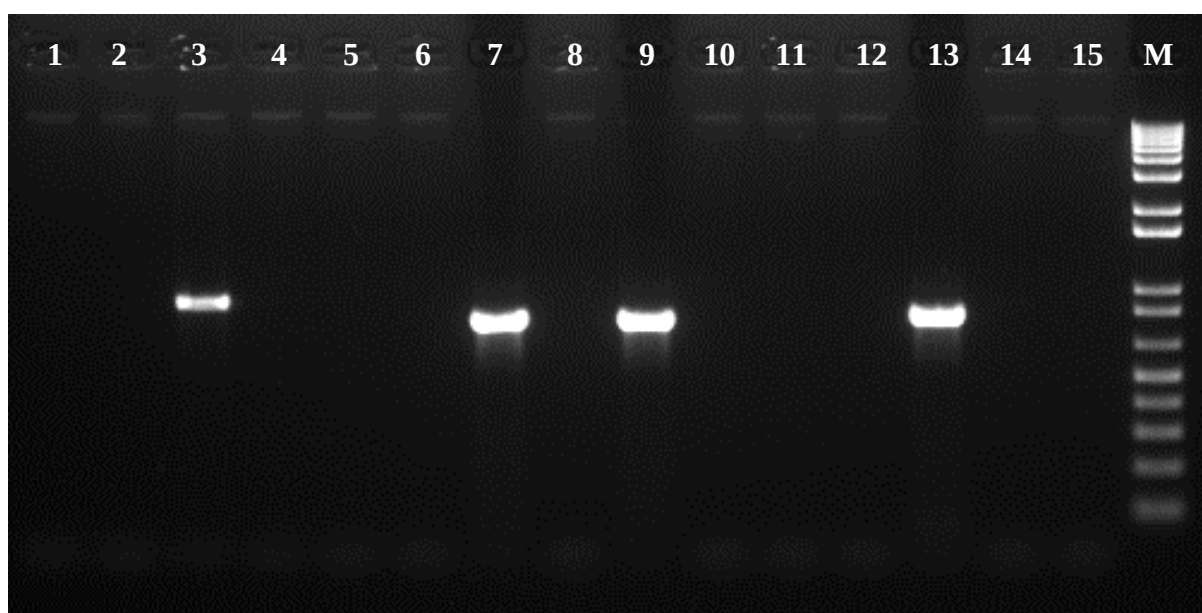


Figura 6- Confirmação da presença do gene *sul1* (840pb). 1-12 isolados de *Salmonella* spp. 13: Controle positivo: *S. Typhimurium* 22C; 14: Controle negativo: *E. coli* ATCC 25922; 15: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).

3.4. Discussão

De acordo com a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2001), carcaças bovinas inteiras ou fracionadas, quartos, cortes cárneos e carne moída devem apresentar ausência de *Salmonella* spp. em 25 g do alimento. No presente estudo, avaliou-se superfícies de dianteiros, cortes cárneos e carne moída e, encontrou-se 11,71% (14/128) das amostras positivas para *Salmonella* spp., estando em desacordo com o parâmetro exigido.

Cossi et al. (2014) ao avaliarem a presença de *Salmonella* spp. em superfícies de dianteiros bovinos em três frigoríficos no estado de Minas Gerais no Brasil, verificaram a presença deste patógeno em 1,43%(3/09) amostras analisadas. Da mesma forma, Dong et al. (2014), ao analisarem superfícies de dianteiros em frigoríficos na China, verificaram 1,25% (1/80) positiva para *Salmonella* spp. Estes resultados evidenciam a contaminação das carcaças bovinas e seus cortes. Neste estudo, a presença de *Salmonella* spp. foi verificada em uma dentre 32 amostras de superfícies de dianteiro analisadas.

Carney et al. (2006) comentam que o couro do animal, o extravasamento do conteúdo gastrointestinal e o contato entre os dianteiros podem ser fontes de contaminação de todos os cortes cárneos. A fim de reduzir a contaminação por micro-organismos patogênicos durante o processamento da carne, as etapas realizadas no matadouro-frigorífico devem ser executadas com a utilização de Boas Práticas de Fabricação (BPF's), assegurando a qualidade microbiológica dos cortes cárneos, aumentando a vida útil destes produtos (YANG et al., 2010). Muitos surtos de doenças transmitidas por alimentos têm sido associados à contaminação cruzada entre utensílios e cortes, entre os cortes e ainda entre manipuladores e cortes (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCIA-GIMENO, 2012).

Pérez-Rodríguez et al., (2008) descrevem vários fatores relacionados à contaminação cruzada, como práticas de higiene inadequadas, equipamentos contaminados, processamento e armazenamento inadequado e contaminação via manipuladores, o que pode justificar um número maior de isolados nas cortes cárneas oferecidos nos balcões quando comparado as superfícies dos dianteiros.

Os cortes cárneas oferecidos nos balcões são obtidos a partir dos dianteiros, após manipulação. A contaminação pode ser devido a falhas nos processos de higienização dos equipamentos, manipuladores, utensílios e superfícies (YOUSSEF et al., 2013). Além disso, segundo Pereira et al. (2002), esta contaminação pode aumentar em função da disposição incorreta e acúmulo de cortes no interior das câmaras frias, ocasionando má circulação do ar frio e consequentemente aumento da temperatura, possibilitando multiplicação bacteriana e contaminação cruzada entre os cortes cárneos.

A conscientização dos manipuladores para que sejam realizadas as práticas higiênicas-sanitárias adequadas e a correta higienização, deve ser obrigação do estabelecimento, através da utilização de treinamentos periódicos (COUTINHO, 2007; SOARES et al., 2013). Naidoo e Lindsay (2010) destacam a importância do controle dos procedimentos de higiene operacional nos locais que comercializam cortes cárneos, visto que a contaminação cruzada entre utensílios, manipuladores e cortes pode ser reduzida e até evitada, quando se realiza o processo corretamente.

Tafida et al. (2013), ao analisarem cortes cárneos oferecidos em grandes quantidades nos balcões de atendimento em supermercados localizados em Zaria na Nigéria, verificaram 2,43% (9/370) das amostras positivas para *Salmonella* spp. De maneira similar, Maka et al. (2014) verificaram a presença do mesmo patógeno em 2,9% (3/106) das amostras de cortes cárneos embalados prontos para venda em balcões de autoatendimento no varejo da Polônia entre os anos de 2008 e 2012. No presente estudo, *Salmonella* spp. foi encontrada em 12,5% (4/32) das amostras de cortes cárneos do balcão de atendimento e em 6,25% (2/32) dos cortes cárneos do autoatendimento.

Com relação às amostras de carne moída, estas são preparadas nos açougues a partir de retalhos dos dianteiros, dos cortes de dianteiros que são colocados nos balcões de atendimento e autoatendimento, sendo posteriormente comercializadas no balcão de atendimento. Neste trabalho obteve-se a presença de *Salmonella* spp. em

21,87% (7/32) das amostras de carne moída analisadas. Foi verificada a presença deste patógeno em um número superior de amostras quando comparado às amostras de dianteiros e cortes cárneos do balcão de atendimento e do autoatendimento. Esta contaminação indica má higienização dos utensílios utilizados no preparo, juntamente com a intensa manipulação durante seu processamento da carne moída. Além disso, o tempo que os cortes ficam expostos nos balcões, associado à possível oscilação de temperatura durante este armazenamento favorecem a contaminação e a multiplicação de micro-organismos nas amostras de carne moída (MREMA, MPUCHANE e GASHE, 2006; SALLAM et al., 2014).

Neste trabalho, também foram coletadas amostras de superfície das balanças utilizadas para a pesagem dos cortes nos açougues dos supermercados, não tendo sido verificada a presença de *Salmonella* spp.. Há poucos estudos sobre a presença destes patógenos neste tipo de superfícies. PAL, LABUZA, DIEZ-GONZALEZ (2008) citam que as superfícies dos utensílios utilizados durante o preparo dos cortes são capazes de disseminar um elevado número de micro-organismos para cada corte processado, ocorrendo contaminação cruzada entre o utensílio e o corte. Ainda, neste caso, pode ocasionar contaminação de outros cortes que entram em contato com este mesmo utensílio ou com o próprio corte contaminado.

No presente estudo, o gene *hlyA* foi verificado em 100% (14/14) dos isolados, confirmando o gênero *Salmonella* spp. Da mesma forma, verificou-se a presença do gene *invA* (Figura 2), indicando capacidade de invasão nas células do hospedeiro.

Os genes *sefA* e *pefA* foram encontrados em dois isolados de *Salmonella* spp. do presente estudo. Em *Salmonella* spp. alguns dos genes responsáveis pela expressão de fímbrias são o *sefA* e *pefA*, expressando as fímbrias SEF (*Salmonella Enteritidis Fimbriae*) e PEF (*Plasmid Encoded Fimbriae*), respectivamente. Para que os micro-organismos possam invadir as células, é necessário primeiramente a adesão na superfície das células, para isso existem vários mecanismos, sendo que um dos principais é mediado por fímbrias (CLOUTHIER, 1993). Estas auxiliam a fixação do micro-organismo na superfície da célula do hospedeiro contribuindo para sua patogenicidade. A ausência destas dificulta a patogenicidade devido à maior dificuldade de adesão (CRACIUNAS et al., 2010).

Já o gene *spvC* neste estudo foi detectado em 85,7% (12/14) dos isolados de *Salmonella* spp. Este gene é encontrado em plasmídeo bacteriano, sendo responsável

pelo aumento da taxa de crescimento e multiplicação da *Salmonella* spp. no interior da célula do hospedeiro, podendo afetar a interação com o sistema imune, potencializando a ação dos micro-organismos (SWAMY et al. 1996).

Os micro-organismos podem apresentar resistência natural, sendo que esta resistência pode ser adquirida por meio de outros micro-organismo ou através da má administração de fármacos em animais e em seres humanos, as cepas resistentes aos antimicrobianos podem acarretar sérios problemas na saúde dos consumidores (BLAHA, 2011; SALLAM et al. 2014).

Foi verificado um perfil de resistência de *Salmonella* spp. frente a sete dos oito antimicrobianos testados. Em relação à sulfonamidas e Ácido nalidíxico, 85,7% dos isolados apresentaram resistência. Todos os isolados testados apresentaram a suscetibilidade frente a Ciprofloxacina (100%), e 85,8% a Ceftazidima (85,8%).

A resistência aos antimicrobianos é um importante fator em relação à gravidade das Salmoneloses, visto que, cepas resistentes são mais difíceis de tratar, levando a uma terapia mais longa e até inadequada (MAGIOORAKOS et al., 2009). Perfis de resistência de isolados de *Salmonella* spp. frente ao ácido nalidíxico e a sulfonamidas também foi verificada por Maka et al. (2014). Porém, em relação à ciprofloxacina e a ceftazidima, este mesmo estudo encontrou 100% de suscetibilidade dos isolados testados. O gene *blaZ* codifica enzimas β -lactamases, enquanto os genes *strA* e *strB* codificam as enzimas que degradam as moléculas dos antimicrobianos ao entrarem no citoplasma bacteriano. Já os genes *sul1* e *sul2* codificam enzimas que impedem a ligação do antimicrobiano no seu local de ação (FERNANDES et al., 2009; VANHOEK et al., 2011; FOLSTER ET AL., 2012).

Dependendo da expressão gênica, juntamente com outros mecanismos realizados pelos micro-organismos, a resistência aos antimicrobianos pode ser influenciada pela exposição ao agente antimicrobiano e pela expressão seletiva que este determina, sendo esta favorecida pelo uso indiscriminado dos antimicrobianos (CHARPENTIER, COURVALIN, 1999; WEESE, 2006). Os mecanismos genéticos apresentados pelos micro-organismos multi-resistentes são de grande interesse devido à elevada incidência, uma vez que um dos principais fatores do desenvolvimento de cepas resistentes é a capacidade dos micro-organismos de adquirir e disseminar elementos genéticos, conferindo a resistência para outros micro-organismos (DIONISI et al., 2011; HOPKINS et al., 2007).

Neste estudo não foi detectada a presença do gene *blaZ* em nenhum dos isolados. Já em relação ao gene *sul1*, este foi detectado em 25% (3/12) dos isolados. Os genes *sul2*, *srtA* e *strB* não foram encontrados nos isolados de *Salmonella* spp. testados. A resistência a antimicrobianos é conferida através de mecanismos de resistência como alteração da permeabilidade de membrana, alteração no sítio de ação, bomba de efluxo, além de mecanismos enzimáticos. A resistência aos antimicrobianos verificada fenotipicamente indica que estes isolados possuem outros genes e/ou mecanismos conferindo tal resistência, visto que não apresentaram os genes responsáveis por esta resistência.

3.5. Conclusão

Pode-se verificar que houve presença de *Salmonella* spp., em 9,72% (14/144) amostras avaliadas, o que indica falhas nas condições higiênico-sanitárias durante o processamento dos cortes cárneos comercializados em açougues de supermercados localizados na região Sul do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ainda, a presença de cepas resistentes a antimicrobianos nas amostras avaliadas demonstra que em caso de DTAs, pode haver dificuldades no tratamento dos consumidores, configurando-se em um grave problema de saúde pública.

3.6. Referências

Abbassi-Ghozzi, I.; Jaouani, A.; Hammami, S.; Martinez-Urtaza, J.; Boudabous, A.; Gtari, A. (2012) Molecular analysis and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from raw meat marketed in the área of “ Grand Tunis”, Tunisia. **Pathologie Biologie**. n. 60, p 49-54.

ABIEC. (2015) Associação Brasileira das Indústrias Expostadoras de Carne. Disponível em: http://www.abiec.com.br/download/Anual_jan_ago_2015.pdf. Acesso em: agosto, 2015

ABRAS. (2015) Associação Brasileira de Supermercados. Disponível em: <http://www.abrasnet.com.br/economia-e-pesquisa/indice-de-vendas/>. Acesso em: julho, 2015.

Alonso, M. Z.; Lucchesi, P. M. A.; Rodríguez, E. M.; Parma, A. E.; Padola, N. L. (2012) Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. **Food Control**. n.23, p.351-355.

Blaha, T. (2011) The use of antimicrobial substances in food animals: the pig Picture. **9th International Conference on linical and Physical Hazards in Pigs and Pork**, Maastricht, v.1, p. 131-133.

BRASIL- Portaria do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. **Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol, nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.**D.O.U. 30/06/2003.

BRASIL- Portaria do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 24, de novembro de 2004. **Proíbe a fabricação, a importação a comercialização e o uso da substância química denominada olaquinox, como aditivo promotor de crescimento em animais produtores de alimentos.** D.O.U. 25/11/2004.

BRASIL. (2014) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Dispõe sobre os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: abril, 2014.

BRASIL. (2015) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Bovinos e bubalinos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: junho, 2015.

BRASIL. (2015a) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Bovinos e bubalinos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>> Acesso em: junho, 2015a.

BRASIL. (2001) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Resolução RDC nº. 12 de 2 de janeiro de 2001.

Carney, E., O'brien, S. B., Sheridan, J. J., McDowell, D.A., Blair, I. S., Duffy, G. (2006) Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. **Food Microbiology.** n. 23, p. 52-59.

Carrasco, E.; Morales-Rueda, A.; Garcia-Gimeno, R.M. (2012) Cross-contaminations and recontamination by *Salmonella* in foods: a review. **Food Research International.** n. 45, p. 545-556.

Castellani, P.; Scapin, R. M.; Alberghini, L.; Radu I. L.; Giaccone, V. (2014) Levels of microbial contamination of domestic refrigerators in Italy. **Food Control.** n. 42, p. 257-262.

CDC (2015) Center for Disease Control and Prevention. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Disease. Disponível em: <https://translate.google.com.br/translate?hl=pt-BR&sl=en&u=http://www.cdc.gov/&prev=search>. Acesso em Novembro, 2015.

Charimba, G.; Hugo, C.; Hugo, A. (2012) The incidence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in minced beef and boerewors. **Food Research International.** n. 47, p. 353-358.

Charpentier, E.; Courvalin, P.(1999) Antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2103-2018.

Clouthier, S. C.; Muller, K.H.; Doran, J.L. (1993) Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Bacteriology**. n.9, p. 2523-2533.

CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2006) **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolates of Fastidious Bacteria; Approved Guideline**, Wayne, PA, USA.

CNA. (2015) Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Pecuária de corte. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/home/comissao/182/pecuaria-de-corte> Acesso em: junho, 2015.

Cossi, M. V. C.; Burin, R. C. K.; Camargo, A. C.; Dias, M. R.; Lanna, F. G. P. A.; Pinto, P. S. A.; Nero, L. A. (2014) Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. **Food Control**. n. 40, p. 320-323.

Crăciunas, C., Keul, A. L., Flonta, M., Cristea, M. (2012) DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hilA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. **Journal of Environmental Management**, 95, p. 15-18.

Cunha, B. A. (1998) Antibiotic resistance. **Drugs of Today**, v34, p. 691-698.

Dionisi, A. M.; Lucarelli, C.; Benedetti, I.; Owczarek, S.; Luzzi, I. (2011) Molecular characterisation of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Infantis from humans, animals and the environment in Italy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n 35, p. 384-389.

Dallal, M. M. S.; Doyle, M.P. Rezadehbashi, M.; Dabiri, H.; Sanaei, M.; Modarresi, S.; Bakhtiari, R.; Sharifiy, K.; Taremi, M.; Zali, M.; Sharifi-Yazdi, M. (2010) Prevalence and

antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. Isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. **Food Control**. n. 21, p. 388-392.

Dong, P.; Zhu, L.; Mao, Y.; Liang, R.; Ni, L.; Zhang, Y.; Li, K.; Luo, X. (2014) Prevalence and profile of *Salmonella* from samples along the production line in Chinese beef processing plants. **Food Control**. n. 38, p. 54-60.

Fantelli, K.; Stephan, R. (2001) Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**. n 70, p. 63-69.

FAO (2015) Global forum of food safety regulators Disponível em: <http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/OO4/AB524E.html>. Acesso em: Agosto, 2015

FDA - U. S. Food and Drug Administration (2015) BAM: Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Publicado em: Setembro, 2002. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm#conventional>>. Acesso em: setembro, 2015.

Fernandes, S. A.; Paterson, D. L.; Ghilardi-Rodrigues, A. C.; Adams-Haduch, J. M.; Tavechio, A. T.; Doy, Y. (2009) CTX-M-2-producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, n 15, p. 317-321.

Flores, R. A., Tamplin, M. L., Marmer, B. S., Phillips, J. G., Cooke, P.H. (2006) Transfer coefficient models for *Escherichia coli* O157:H7 on contacts between tissue and high-density polyethylene surfaces. **Journal of food Protect**. n. 69, p. 1248-1255.

Folster, J. P.; Pecic, G.; Singh, A. Duval, B.; Rickert, R.; Ayers, S. (2012) Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from food animals, retail meat, and humans in the United States 2009. **Foodborne Pathogens Disease**, n. 9, p. 638-645.

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

Gill, C.O.(1998) Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A.; BOARD, R. **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, p. 118-157.

Grape, M., Sundstrom, L.; Kronvall, G. (2003) Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. **J. Antimicrob Chemother** n.52, 1022–1024.

Graziani, C.; Busani, L.; Dionisi, A. M.; Lucarelli, C.; Owczarek, S.; Ricci, A.; Mancin, M.; Caprioli, A.; Luzzi, I.(2008) Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. **Veterinary Microbiology**. v. 128, p. 414-418.

Green, M. R. And Sambrook, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012. 4^a edição.

Habing, G.G., Lombard, J. E., Koprak, C. A., Dargatz, D, A., Kaneene J. B., Farm-level associations with the shedding of *Salmonella* and antimicrobial-resistant *Salmonella* in U.S. dairy cattle. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 9, p. 815–821, 2012.

Haneda, T., Okada, N., Nakazawa, N., Kawakami, T., & Danbar, H. (2001) Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enteric* serovar Choleraesuis. **Infection and Immunity**, 69, 4, 2612–2620.

Guardabassi, L; Courvalin. P. (2006) Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**, Whashington, p. 1-18.

Heuvelink, A. E.; Roessink, G. L.; Bosboom, K.; Boer, E. (2001) Zero tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.66, n.1-2, p.13-20.

Hoffmann, F. L. (2001) Fatores limitantes à proliferação de micro-organismos em alimentos. **Brasil Alimentos**. v. 9. p. 14-23.

Hopkins, K. L.; Batchelor, M. J.; Anjum, M.; Davies, R. H.; Threlfall, E. J. (2007) Comparison of antimicrobial resistance genes in nontyphoidal *Salmonella* of serotypes Enteritidis, Hadar, and Virchow from humans and food-producing animals in England and Wales. **Microbial Drug Resistance**, n 13, p. 281-288.

Hobbs, B.C.; Roberts, D. (1999) **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. Varela, São Paulo, 425p.

Jay, J. M. (1996) **Modern food microbiology**. 5a edição. Editora Chapman & Hall. New York: Van Nostrand Reinhold.

Jones, T. H.; Nattress, F. M.; Dilts, B.; Olsen, D.; Muehlhauser, V. (2014) Numbers of coliforms, *Escherichia coli*, F-RNA phage, rotavirus, bovine enteric calicivirus and presence of non-O157 STEC on commercial vacuum packaged beef. **Food microbiology**. n. 42, p. 225-231.

Kehrenberg, C. And Schwarz, S. (2001) Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. **FEMS Microbiol Lettn**. 18, 283-290.

Kern, M.B., Klemmensen, T., Frimodt-Møller, N. And Espersen, F. (2002) Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. **J Antimicrob Chemother**. 50, 513–516.

Kikuvi, G. M., Schwarz, S., Ombui, J.N., Mitema, E.S. AndKehrenberg, C. (2007) Streptomycin and chloramphenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolates from cattle, pigs, and chicken in Kenya. **Microbiology Drug Resistence**.13, 62-68.

Maka, L.; Mackiw, E.; Sciezynska, H.; Pawlowska, K.; Popowska, M. (2014) Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from retail meat products in Poland between 2008 and 2 012. **Food Control**. n. 36, p. 199-204.

Martineau, F., Picard, F.J., Grenier, L., Roy, P.H., Ouellette, M. And Bergeron, M.G. (2000) Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. The ESPRIT Trial. **J Antimicrob Chemother** n.46, 527–534.

Minihan, D.; O'mahony,M.; Whyte,P.; Collins,J.D.(2003) An investigation on the effect of transport and lairage on the faecal shedding prevalence of *Escherichia coli* o157 in cattle. **Journal of Veterinary Medicine**. n.50, p. 378-382.

Morelli, E.; Noel, V.; Rosset, P.; Poumyrol, G. (2012) Performance and conditions of use of refrigerated display cabinets among producer/vendors of foodstuffs. **Food Control**. n. 26, p.363-368.

Mrema, N.; Mpuchane, S.; Gashe, B. A.(2006) Prevalence of *Salmonella* in raw minced meat, raw fresh sausages and raw burger patties from retail outlets in Gaborone, Botswana. **Food Control**. n. 17, p. 207-212.

Naidoo, K. E Lindsay, D. (2010) Potential cross-contamination of the ready-to-eat dried meat product, biltong. **British Food Journal**, n. 112, p. 350-363.

Nastasijevic, I.; Mitrovic, R.; Buncic, S. (2009) The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. **Meat Science**. n.82, p.101-105.

Oliveira,S.D.; Rodenbusch, C.R.; Michael,G.B; Cardoso,M. I. R.; Canal, C. W.; Brandelli, A. (2003) Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**. n. 1, p. 123-124.

Pal, A.; Labuza, T. P.; Diez-Gonzalez, F. (2008) Shelf life evolution for ready-to-eat sliced uncured turkey breast and cured ham under probable storage conditions based on *Listeria monocytogenes* and psychrotroph growth. **International Journal of Food Microbiology**, n. 126, p. 49-56.

Pardi, M. C.; Santos, I. F.; Souza, E. R.; Pardi, H. S.; (2006) **Ciência, higiene e tecnologia da carne**, v. 1, Goiânia - GO: Editora UFG.

Pereira, M. P. D.; Oliveira, C. S.; Pereira, I. A.; Martins, G. C.; Rodrigues, M. C. D.; Santo, R. E.; Campos, F. L.; Lopes, R. A.; Campos, S. G.; Souza, M. M. S. (2002) Avaliação qualitativa da microbiota contaminante em açougues no município de Seropédica como indicador de qualidade higiênico-sanitária. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 22, n. 2, p. 147-150.

Péres-Rodrigues, F.; Valero, A.; Carrasco, E.; Garcia-Gimeno, R. M.; Zurera, G. (2008) Understanding and modeling bacterial transfer to foods: A review. **Trends in Food Science and Technology**, n. 19, p. 131-144.

Pigatto, C. P.; Calomeno, M. A.; Bacila, M. (2003) Analysis of the microbial population in the water used for carcass washing and in bovine carcass at a slaughter house. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 43-46.

Popowska, M.; Rzezzycka, M.; Miernik, A.; Krawczyk-Balska, A.; Walsh, F.; Duffy, B. (2012) Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associate resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. n. 56, p1434-1443.

Rio Grande Do Sul. Portaria nº78 de 30 de janeiro de 2009. Dispõe sobre a lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. Secretaria da Saúde, Porto Alegre, 2009.

Sallam, K. I.; Mohaammed, M. A.; Hassan, M. A.; Tamura, T. (2014) Prevalence, molecular identification and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from retail beef products in Mansoura, Egypt. **FoodControl**. n. 38. p. 209-214.

Sarantópoulos, C.I.G.L.; Oliveira, L.M. Canavesi, E. (2001) Requisitos de Conservação de Alimentos em Embalagens Flexíveis. Campinas: **CETEA/ITAL**.

Skov, M.N.; Andersen, J.S.; Aabo, S.; Ethelberg, S.; Aarestrup, F. M.; Sorensen, A. H.; Sorensen, G.; Pedersen, K.; Nordentoft, S.; Olsen, K. E.; Gerner-Smidt, P.; Baggesen, D.L. (2007) Antimicrobial drug resistance of *Salmonella* isolates from meat and humans, Denmark. **Emerging Infection Disease**. v.13. n.4, p.638-641.

Snydman, D.R. (2002) Doenças Transmitidas por Alimentos. In SCHAECHTER, Ed. **Microbiologia**. Rio de Janeiro, Guanabara koogan, 593p.

Soares, K. García-Díez, J. Esteves, A. Oliveira, I. Saraiva, C. (2013) Evaluation of food safety training on hygienic conditions in food establishments. **Food Control**. N.34, p. 613-618.

Stevens, A., Kerouanton, A., Maraut, M., Millemann, Y., Brisabois, A., Cavin, J.F. Dufour, B. (2008) Epidemiological analysis of *Salmonella* enterica from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed –field electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. **International Journal Food Microbiology**. n.123: 191-97.

Swamy, S. C., Barnhart, H. M., Lee, M. D., & Dreesen D. W. (1996) Virulence Determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* isolated from Poultry Products, Wastewater, and Human Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 10, 3768–3771.

Tafida, S. Y.; Kabir, J.; Kwaga, J. K. P.; Bello, M.; Umoh, V. J.; Yakubu, S.E.; Nok, A. J.; Hendriksen, R. (2013) Occurrence of *Salmonella* in retail beef and related meat products in Zaria, Nigeria. **Food Control**. n.32, p. 119-124.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. (2012) **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre – RS, ARTMED, p.967.

Vanhoek, A. H.; Mevius, D.; Guerra, B.; Mullany, P.; Roberts, A. P.; Aarts, H.J. (2011) Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**. n. 02 p.203-209.

Valone, S. E.; Chikami, V. L.; Miller. (1993) Stress induction of the virulence protein (*spvA-B*, and *C*) from native plasmid pSDL2 of *Salmonella* Dublin. **Infectology and Immunology**, n. 61, p. 705-713.

Wang, H.; Zhang, X.; Zhang, Q.; Ye, K.; Xu, X.; Zhou, G. (2015) Comparison of microbial transfer rates from *Salmonella* spp. Biofilm growth on stainless steel to selected processed and raw meat. **Food Control**. n. 50, p. 574-580.

Weese, J. S. (2006) Investigation of antimicrobial use and the impact of antimicrobial use guidelines in a small animal veterinary teaching hospital: 1995-2004. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 228, p. 553-558.

Wheeler, T. L.; Kalchayanand, N.; Bosilevac, J.M. (2014) Pre and post-harvest interventions to reduce pathogen contamination in the U.S. beef industry. **Meat Science**. n. 98. p. 372-382.

Woodward, M. J., & Kirwan, S. E. (1996) Detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs by the polymerase chain reaction. **Veterinary Record**, 138, 411-413.

World Health Organization (WHO) (2015). Fact Sheet Number 237: Food safety and foodborne illness. Geneva Switzerland. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>. Acesso em outubro, 2015.

Yang,B.; Qu. D.; Zhang, X.; Shen, J.; Cui, S.; Shi, Y.; Xi, M.; Sheng, M.; Zhi, S.; Meng, J. (2010) Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. **International Journal of Food Microbiology**. n141, p. 63-72.

Youssef, M. K., Badoni, M., Yang, X., Gill, C.O. (2013) Sources of *Escherichia coli* deposited on beef during breaking of carcasses carrying few *E. coli* at two packing plants. **Food Control**. n. 31, p. 166-171.

Zottola, E. A.; Sasahara, K. C. (1994) Microbial biofilms in the food processing industry should they be a concern. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, n.2, p.125-148.

4. Considerações Finais

Pode-se verificar que houve presença de *Salmonella* spp., em 9,72% (14/144) amostras avaliadas, o que indica falhas nas condições higiênico-sanitárias durante o processamento dos cortes cárneos comercializados em açougues de supermercados localizados na região Sul do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, tornando-se necessária a supervisão nos processos, na higiene pessoal e das instalações dos açougues, visando a redução da contaminação dos produtos oferecidos e assegurando a saúde do consumidor.

Ainda, a presença de cepas resistentes a antimicrobianos nas amostras avaliadas demonstra que em caso de DTAs, pode haver dificuldades no tratamento dos consumidores, configurando-se em um grave problema de saúde pública.

5. Referências Bibliográficas

ABBASSI-GHOZZI, I.; JAOUANI, A.; HAMMAMI, S.; MARTINEZ-URTAZA, J.; BOUDABOUS, A.; GTARI, A. Molecular analysis and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from raw meat marketed in the área of “ Grand Tunis”, Tunisia. **Pathologie Biologie**. n. 60, p 49-54, 2012.

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em: http://www.abiec.com.br/download/stat_mercadomundial.pdf. Acesso em: outubro, 2014.

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em: http://www.abiec.com.br/download/Anual_jan_ago_2015.pdf. Acesso em: agosto, 2015

ABRAS. Associação Brasileira de Supermercados. Disponível em: <http://www.abrasnet.com.br/economia-e-pesquisa/indice-de-vendas/>. Acesso em: julho, 2015.

AGAS. Associação Gaúcha de Supermercados. Disponível em: <http://www.agas.com.br/site/default.asp?TroncoID=708180&SecaoID=939263&SubsecaoID=0>. Acesso em: dezembro, 2015

ALONSO, M. Z.; LUCCHESI, P. M. A.; RODRÍGUES, E. M.; PARMA, A. E.; PADOLA, N. L. Enterpathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. **FoodControl**. n.23, p.351-355, 2012.

BRASIL- Portaria do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. **Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol, nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.** D.O.U. 30/06/2003.

BRASIL- Portaria do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 24, de novembro de 2004. **Proíbe a fabricação, a importação a comercialização e o uso da substância química denominada olaquinox, como aditivo promotor de crescimento em animais produtores de alimentos.** D.O.U. 25/11/2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Bovinos e bubalinos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: junho, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Bovinos e bubalinos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>> Acesso em: junho, 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Resolução RDC nº. 12 de 2 de janeiro de 2001.

BUNCIC,S.; SOFOS. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. **Food Research International.** n. 45, p. 641-655, 2012.

CARNEY, E., O'BRIEN, S. B., SHERIDAN, J. J., McDOWELL, D.A., BLAIR, I. S., DUFFY,G. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. **Food Microbiology.** n. 23, p. 52-59, 2006.

CARRASCO,E; MORALES-RUEDA,A; GARCIA-GIMENO,R,M. Cross-contaminations and recontamination by *Salmonella* in foods: a review. **Food Research International**. n. 45, p. 545-556, 2012.

CASTELLANI, P.; SCAPIN, R. M.; ALBERGHINI, L.; RADU I. L.; GIACCONE, V. Levels of microbial contamination of domestic refrigerators in Italy. **Food Control**. n. 42, p. 257-262, 2014.

CHARIMBA, G.; HUGO, C.; HUGO, A. The incidence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in minced beef and boerewors. **Food Research International**. n. 47, p. 353-358, 2012.

CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Pecuária de corte. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/home/comissao/182/pecuaria-de-corte>>. Acesso em: junho, 2015.

COSSI, M. V. C.; BURIN, R. C. K.; CAMARGO, A. C.; DIAS, M, R.; LANNA, F. G. P. A.; PINTO, P. S. A.; NERO, L. A. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. **Food Control**. n. 40, p. 320-323. 2014.

DOMINGUES, S.; DA SILVA, G. J.; NIELSEN, K. M. Integrins: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. **Mobile Genetic Elements**. n. 5, p. 211-223, 2012.

DONG, P.; ZHU, L.; MAO, Y.; LIANG, R.; NI, L.; ZHANG, Y.; LI, K.; LUO,X. Prevalence and profile of *Salmonella* from samples along the production line in Chinese beef processing plants. **Food Control**. n. 38, p. 54-60, 2014.

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**. n 70, p. 63-69, 2001.

FAO Global forum of food safety regulators Disponível em: <http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/OO4/AB524E.html> Acesso em: Agosto, 2015

FERNANDES, S. A.; PATERSON, D. L.; GHILARDI-RODRIGUES, A. C.; ADAMS-HADUCH, J. M.; TAVECHIO, A. T.; DOY, Y. CTX-M-2-producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, n 15, p. 317-321, 2009.

FERREIRA, R; SIMM, E. M. Análise microbiológica da carne moída de um açougue da região central do município de Pará de Minas/MG. **Revista Digital FAPAM**, Pará de Minas, n.3, p. 37 - 61, 2012.

FOLSTER, J. P.; PECIC, G.; SINGH, A. DUVAL, B.; RICKERT, R.; AYERS, S. Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella entericas* serovar Heidelberg isolated from food animals, retail meat, and humans in the United States 2009. **Food borne Pathogens Disease**, n. 9, p. 638-645, 2012.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FIESP- Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/noticias/consumidor-brasileiro-busca-alimentos-praticos-e-rapidos-aponta-pesquisa-da-fiesp-e-ibope/> Acesso em outubro, 2014.

GILL, C.O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A.; BOARD, R. **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998, p. 118-157.

GRAZIANI, C.; BUSANI, L.; DIONISI, A. M.; LUCARELLI, C.; OWCZAREK, S.; RICCI, A.; MANCIN, M.; CAPRIOLI, A.; LUZZI, I. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. **Veterinary Microbiology**. v. 128, p. 414-418, 2008.

HEUVELINK, A. E.; ROESSINK, G. L.; BOSBOOM, K.; BOER, E.; Zero tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.66, n.1-2, p.13-20, 2001.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. Varela, São Paulo, 1999. 425p.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de micro-organismos em alimentos. **Brasil Alimentos**. v. 9. p. 14-23. 2001.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P.H.A.; STALLEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9 ed. Williams and Wilkins, Philadelphia, 1994, 1134p.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 5a edição. Editora Chapman & Hall. New York: Van Nostrand Reinhold, 1996.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. Maryland: Aspen, 6ed, 2005. 679p.

JONES, T. H.; NATRESS, F. M.; DILTS, B.; OLSEN, D.; MUEHLHAUSER, V. Numbers of coliforms, *Escherichia coli*, F-RNA phage, rotavirus, bovine enteric calicivirus and presence of non- O157 STEC on commercial vacuum packaged beef. **Food microbiology**. n. 42, p. 225-231, 2014.

LANGRIDGE, G. C.; PHAN, M. D.; PERKINS, T. T.; PARTS, L.; HAASE, J.; CHARLES, I.; MASKELL, D. J.; PETERS, S. E.; DOUGAN, G.; WAIN, J.; PARKHILL, J.; TURNER, A. K.; Simultaneous assay of every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants. **Genome Research**. n. 19, p. 2308-2316, 2009.

MAKA, L.; MACKIW, E.; SCIEZYNSKA, H.; PAWLOWSKA, K.; POPOWSKA, M. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from retail meat products in Poland between 2008 and 2012. **Food Control**. n. 36, p. 199-204, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P. L.; CLARK, D. P. Princípios de Genética Bacteriana. **Microbiologia de Brock**. 12ed. Porto Alegre: Artmed,2010. P. 278-283.

MATOS, V. S. R.; GOMES,A. P. P.; SANTOS, V. A.; FREITAS, F.; SILVA, I. M. M. Perfil sanitário da carne bovina *in natura* comercializada em supermercados. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. n. 71, p. 187-92, 2012.

MINIHAN, D.; O'MAHONY,M.; WHYTE,P.; COLLINS,J.D. An investigation on the effect of transport and lairage on the faecal shedding prevalence of *Escherichia coli* o157 in cattle. **Journal of Veterinary Medicine**. n.50, p. 378-382, 2003.

MORELLI, E.; NOEL, V.; ROSSET, P.; POUMYROL, G. Performance and conditions of use of refrigerated display cabinets among producer/vendors of foodstuffs. **Food Control**. n. 26, p.363-368, 2012.

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

NASTASIJEVIC, I.; MITROVIC, R.; BUNCIC, S. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. **Meat Science**. n.82, p.101-105, 2009.

NEWTRADE. O portal de notícias do comércio. Disponível em: <http://newtrade.com.br/categoria/geral/varejo/>. Acesso em: novembro, 2015.

OLIVEIRA, S.; SILVA, J. A.; MACIEL, J. F.; AQUINO, J. S. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de carne bovina comercializada em supermercados de Joao Pessoa. **Alimentação Nutrição**. Araraquara, v.19, n.1, p. 61-66, 2008.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S.; **Ciência, higiene e tecnologia da carne**, v. 1, Goiânia - GO: Editora UFG, 2006.

PIGATTO, C. P.; CALOMENO, M. A.; BACILA, M. Analysis of the microbial population in the water used for carcass washing and in bovine carcass at a slaughter house. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 43-46, 2003.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2001 to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**. n. 3, p. 173-174, 2003.

POPOWSKA, M.; RZECZYCKA, M.; MIERNIK, A.; KRAWCZYK-BALSKA, A.; WALSH, F.; DUFFY, B. Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associate resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. n. 56, p1434-1443, 2012.

RIO GRANDE DO SUL. Portaria nº78 de 30 de janeiro de 2009. Dispõe sobre a lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. Secretaria da Saúde, Porto Alegre, 2009.

RUIZ, M.; RODRÍGUES, J. C.; ESCRIBANO, I.; ROYO, G. Available options in the management of non-typhi *Salmonella*. **Expert Opinion Pharmacotherapy**. v.5, n.8, p 1737-1743, 2004.

SALLAM, K. I.; MOHAAMMED, M. A.; HASSAN, M. A.; TAMURA, T. Prevalence, molecular identification and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from retail beef products in Mansoura, Egypt. **Food Control**. n. 38. p. 209-214, 2014.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M. CANAVESI, E. **Requisitos de Conservação de Alimentos em Embalagens Flexíveis**. Campinas: CETEA/ITAL, 2001.

SKOV, M.N.; ANDERSEN, J.S.; AABO,S.; ETHELBERG,S.; AARESTRUP, F. M.; SORENSEN, A. H.; SORENSEN, G.; PEDERSEN, K.; NORDENTOFT, S.; OLSEN, K. E.; GERNER-SMIDT, P.; BAGGESEN, D.L. Antimicrobial drug resistance of *Salmonella* isolates from meat and humans, Denmark. **Emerging Infection Disease**. v.13. n.4, p.638-641, 2007.

SNYDMAN, D.R. Doenças Transmitidas por Alimentos. In SCHAECHTER, Ed. **Microbiologia**.Rio de Janeiro, Guanabara koogan, 2002, 593p.

SOARES, K. GARCÍA-DÍEZ, J. ESTEVES, A. OLIVEIRA, I. SARAIVA, C. Evaluation of food safety training on hygienic conditions in food establishments. **Food Control**. N.34, p. 613-618, 2013.

STEVENS, A., KEROUANTON, A., MARAUT, M., MILLEMANN, Y., BRISABOIS, A., CAVIN, J.F. DUFOUR, B. Epidemiological analysis of *Salmonella* enterica from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed –field electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. **International Journal Food Microbiology**.123: 191-97, 2008.

SUPERHIPER- Revista Oficial do setor Supermercado Brasileiro. Disponível em: <http://www.abras.com.br/edicoes-anteriores/Main.php?MagID=&MagNo=64> Acesso em: agosto, 2014.

TAFIDA, S. Y.; KABIR, J.; KWAGA, J. K. P.; BELLO, M.; UMOH, V. J.; YAKUBU, S.E.; NOK, A. J.; HENDRIKSEN, R. Occurrence of *Salmonella* in retail beef and related meat products in Zaria, Nigeria. **Food Control**. n.32, p. 119-124, 2013.

TAMANG, M.D.; NAM, H. M.; KIM, T. S.; LEE, H. S.; KIM, T. S.; JANG, G. C.; JUNG, S. C.; LIM, S. K. Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolate from food animals and humans in Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**. n. 11, p.1199-1206, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre – RS, ARTMED, p.967, 2012.

VANHOEK, A. H.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H.J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**. n. 02 p.203-209, 2011.

WANG, H.; ZHANG, X.; ZHANG, Q.; YE, K.; XU, X.; ZHOU, G. Comparison of microbial transfer rates from *Salmonella* spp. Biofilm growth on stainless steel to selected processed and raw meat. **Food Control**. n. 50, p. 574-580, 2015.

WHEELER, T. L.; KALCHAYANAND, N.; BOSILEVAC, J.M. Pre and post-harvest interventions to reduce pathogen contamination in the U.S. beef industry. **Meat Science**. n. 98. p. 372-382, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Fact Sheet Number 237: Food safety and foodborne illness. Geneva Switzerland. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>. Acesso em outubro, 2015.

YANG, B.; QU, D.; ZHANG, X.; SHEN, J.; CUI, S.; SHI, Y.; XI, M.; SHENG, M.; ZHI, S.; MENG, J. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. **International Journal of Food Microbiology**. n141, p. 63-72, 2010.

YOUSSEF, M. K., BADONI, M., YANG, X., GILL, C.O. Sources of *Escherichia coli* deposited on beef during breaking of carcasses carrying few *E. coli* at two packing plants. **Food Control**. n. 31, p. 166-171, 2013.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry should they be a concern. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, n.2, p.125-148, 1994.