

**DENIS AUGUSTO SPRICIGO**

**ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE SOROVARES  
DE *Salmonella* ISOLADOS DE LINGÜIÇA FRESCAL SUÍNA EM LAGES/SC**

**LAGES-SC**

**2007**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS CAV**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E TECNOLÓGICA**

**DENIS AUGUSTO SPRICIGO**

**ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE SOROVARES  
DE *Salmonella* ISOLADOS DE LINGÜIÇA FRESCAL SUÍNA EM LAGES/SC**

Dissertação apresentada a coordenação  
do curso de Mestrado de Ciências  
Veterinárias, como requisito para a  
obtenção do título de Mestre

**Orientadora:** Dra. Sandra Maria Ferraz

**LAGES-SC**

**2007**

**DENIS AUGUSTO SPRICIGO**

**ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE SOROVARES  
DE *Salmonella* ISOLADOS DE LINGÜIÇA FRESCAL SUÍNA EM LAGES/SC**

Dissertação aprovada a coordenação do curso de Mestrado de Ciências Veterinárias, como requisito para a obtenção do título de Mestre

**Banca examinadora:**

Orientador: \_\_\_\_\_  
Doutora Sandra Maria Ferraz  
UDESC

Membro: \_\_\_\_\_  
Doutora Jalusa Deon Kich  
Embrapa Suínos e Aves

Membro: \_\_\_\_\_  
Doutora Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso  
UFRGS

Lages, 05 de fevereiro de 2007

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo apoio em todos os momentos.

À professora Doutora Sandra Maria Ferraz pela ajuda, interesse e dedicação com que orientou esta dissertação.

Aos bolsistas Misael Espíndola e Suzana Matsumoto pelo auxílio na realização dos trabalhos.

A todos os amigos encontrados no Laboratório de Microbiologia do CAV e outros departamentos, em especial Carolina Grasel, Cristiane Cantelli, Felipe Seixas, Joelma Luciola, Ronise Tochetto e Thomas Bierhals, pelo companheirismo e apoio.

A todas as pessoas que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

## RESUMO

A *Salmonella* sp. é uma das principais causas mundiais de toxinfecção alimentar. Nos últimos anos, as preocupações têm se voltado para a carne e produtos suínos tanto no aspecto de saúde pública como de comercialização/exportação. Dois estudos foram conduzidos com o objetivo de: 1) verificar a prevalência de sorovares de *Salmonella* sp. em lingüiças tipo frescal de matéria-prima suína comercializadas em Lages/SC, bem como seu nível de contaminação; e, 2) verificar o perfil de resistência aos antimicrobianos em linhagens de *Salmonella* isoladas de lingüiças frescal suína. Para tanto, na primeira fase do trabalho, foram coletadas 200 amostras de nove marcas em diferentes estabelecimentos comerciais. No laboratório, foram pesados assepticamente 25 g de cada material coletado. Cada amostra foi submetida a pré-enriquecimento em água peptonada tamponada (37°C/24h), seguido de enriquecimento seletivo em Tetracionato Muller-Kauffmann e Rappaport-Vassiliadis (42°C/24h) e isolamento em agar seletivo Xilose Lisina Tergitol-4 e Verde Brilhante Lactose Sacarose acrescido de Novobiocina. Colônias suspeitas foram identificadas através de perfil bioquímico e sorologia. Das amostras analisadas, foram isoladas *Salmonella* sp. em 27% (54), sendo o sorovar Typhimurium o mais encontrado (20%) num total de 15 sorovares. Em apenas seis amostras foi isolado mais de um sorovar. Apenas uma apresentou uma quantidade de microrganismos capaz de causar enfermidade no homem (>1.100 NMP/g). Na segunda fase, os 60 isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade *in vitro* frente a 14 antimicrobianos através do método de difusão em agar Mueller-Hinton. Das amostras analisadas, 56,67% apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados e o perfil de multi-resistência foi encontrado em 20% das amostras testadas. Os maiores índices de resistência foram apresentados contra sulfonamida (45%) e tetraciclina (41,67%). Nenhuma amostra foi resistente a amoxicilina/ácido clavulânico, cefaclor, gentamicina, neomicina e tobramicina. A amostra com maior índice de resistência (50%) foi do sorovar Schwarzengrund, porém o sorovar Typhimurium foi o que apresentou maior número de isolados multi-resistentes (5/12 – 41,67%). Apesar da maioria dos produtos positivos para *Salmonella* sp. conter uma quantidade de microrganismo abaixo da dose infectante, sua prevalência elevada pode representar um risco ao consumidor. Além disso, o alto número de isolados resistentes encontrado no presente estudo indica a necessidade de futuro monitoramento do uso de antimicrobianos na granja, para controlar o risco de seleção e transmissão de cepas resistentes através da cadeia alimentar.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Salmonella* sp., lingüiça frescal suína, quantificação, resistência antimicrobiana, multi-resistência.

## ABSTRACT

*Salmonella* is one of the main causes of food poisoning. In the last years, the main focus has been on meat and swine products both because of public health concerns and also because of its commercialization/exportation. Two studies were conducted in order to: 1) verify the prevalence of *Salmonella* serovars in fresh pork sausages commercialized in Lages, Santa Catarina and analyze its level of contamination, and 2) determine the profile of antimicrobial resistance in samples of *Salmonella* sp. isolated in fresh pork sausages. For this purpose, 200 samples of nine brands were collected in different commercial stores. At laboratory 25 grs of the collected material was weighed aseptically. Each sample was submitted to a pre-enrichment in buffered water peptone (37°C/24 h) followed by selective enrichment in Tetrathionate Muller-Kauffmann and Rappaport-Vassiliadis (42°C/24h) and isolated in Xylose Lysine Tergitol-4 agar and Brilliant-Phenolred-bile-Lactose-Saccharose agar with Novobiocine. Suspected colonies were confirmed by biochemical and serological tests. Among the samples analyzed, *Salmonella* sp. was isolated from 27% (54). Serovar Typhimurium (20%) accounted for the highest percentage of isolates in a total of 15 serovars. Only one sausage sample had a quantity of *Salmonella* capable of causing diseases in human beings (>1.100 MPN/g). In the second study, the 60 strains were tested against 14 antimicrobials by the agar diffusion method. 56,67% of the analyzed isolates showed resistance to at least one antimicrobial agent, and 20% showed multi-resistance. The highest rate of resistance was detected against sulfonamide (45%) and tetracycline (41%). No sample was resistant to amoxicillin/clavulanic acid, ceflacor, gentamicin, neomycin and tobramycin. The sample that showed resistance against the highest number of antimicrobial agents (7/14) belonged to serovar Schwarzengrund, although serovar Typhimurium presented the highest number of multiresistent isolates (5/12 – 41,67%). Although most products were positive for *Salmonella* sp., in amounts below the infection dosis, their prevalence may be a risk for the consumer. The high number of isolated agents found in the study stresses that future monitoring of the use of antimicrobial agents is necessary to control the risk of selection and transmission of resistant families through the food chain.

**KEYWORDS:** *Salmonella* sp., fresh pork sausage, quantification, antimicrobial resistance, multiresistance.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Número de amostras positivas e frequência de Salmonella sp. em lingüiças tipo frescal suína de diferentes marcas comercializadas em Lages/SC.....	28
Tabela 1.2 – Amostras de lingüiça tipo frescal suína positivas para Salmonella sp. com seus respectivos sorovares e Número Mais Provável por Grama (NMP/g).....	29
Tabela 2.1 – Resistência a antimicrobianos de sorovares de Salmonella isoladas de lingüiças tipo frescal suína comercializadas em Lages/SC.....	41

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 GÊNERO Salmonella.....	10
2.2 IMPORTÂNCIA DA Salmonella sp. EM SAÚDE PÚBLICA.....	12
2.3 CONTAMINAÇÃO DE PRODUTOS FRESCAIS SUÍNOS POR Salmonella sp..	14
3 DESENVOLVIMENTO.....	17
PREVALÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE SOROVARES DE Salmonella sp. ISOLADOS DE LINGÜIÇAS TIPO FRESCAL SUÍNA EM LAGES, SANTA CATARINA.....	17
INTRODUÇÃO.....	20
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM SOROVARES DE Salmonella ISOLADOS DE LINGÜIÇAS TIPO FRESCAL SUÍNA EM LAGES, SANTA CATARINA.....	30
4 Discussão GERAL.....	42
5 CONCLUSÕES FINAIS.....	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50



## 1 INTRODUÇÃO

A epidemiologia das doenças transmitidas por alimentos vem se modificando nos últimos anos. Novos patógenos têm emergido e alguns têm se disseminado mundialmente. Muitos, incluindo *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter* sp. e *Yersinia enterocolitica*, têm reservatórios em animais de produção saudáveis, a partir dos quais têm contaminado uma variedade crescente de alimentos.

Em países desenvolvidos, a maioria das toxinfecções alimentares bacterianas é causada por *Campylobacter jejuni*, porém o grupo das salmonelas não-tifóides encontra-se em segundo lugar com um número expressivo. Oficialmente, são registrados anualmente entre 40.000 a 60.000 casos de doença nos EUA, mas estimativas do número de casos reais chegam a alcançar três milhões. No Brasil, entre o período de 1997-1999 foram investigados 323 surtos, no estado do Rio Grande do Sul, destes 116 (35,7%) foram causados por *Salmonella* sp. (COSTALUNGA e TONDO, 2002).

A salmonelose humana originada de produtos suínos vem crescendo, uma vez que o mercado demanda um aumento na produção dos derivados considerados de alto risco, tais como carne fresca e lingüiça. Como esses produtos não sofrem processamento pelo calor, o que inativaria o microrganismo, sua qualidade

microbiológica acaba dependendo inteiramente da completa ausência de *Salmonella* na matéria-prima.

Além disso, o mercado externo está cada vez mais exigente em relação à qualidade dos produtos de origem animal. Portanto, o Brasil, como quarto maior produtor e exportador de carne suína, deve preocupar-se com agentes biológicos que possam representar barreiras à comercialização. A *Salmonella* sp., como um importante patógeno em saúde pública, enquadra-se neste perfil. Para tanto, antes da implementação de medidas de controle é necessária uma avaliação da situação atual. A determinação da presença desta bactéria em produtos de origem suína em uma região é o ponto crucial para a identificação da situação-problema. A partir desses dados, associados a estudos realizados em granjas e abatedouros, pode-se traçar um programa de controle dentro de uma cadeia produtiva.

Com isso, a proposta desta dissertação foi incrementar a pesquisa sobre *Salmonella* sp., em relação à segurança alimentar de produtos de origem suína. Neste sentido, o presente estudo foi separado em duas etapas principais. Na primeira, avaliou-se a presença e identificaram-se os sorovares de *Salmonella* em lingüiças frescas suínas disponíveis à população e, posteriormente, o nível de contaminação em que se encontrava no produto. Na segunda, identificou-se o perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GÊNERO *Salmonella*

A classificação atual do gênero *Salmonella* é baseada em características bioquímicas, sendo dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (CAMPOS, 1999). A primeira é composta por seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* e *hountenae* (CLARKE e GYLES, 1993). A diferenciação entre as espécies e subespécies baseia-se em propriedades fenotípicas.

Como esta divisão não apresenta importância prática, utiliza-se na rotina, um esquema de identificação denominado esquema de Kauffmann & White, que divide o gênero em tipos sorológicos (sorovares), tendo por base os antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar) (CAMPOS, 1999). Atualmente, existem aproximadamente 2.400 sorovares identificados de *Salmonella* com vasta distribuição na natureza (SCHWARTZ, 2000). No entanto, somente os sorovares da subespécie *enterica* causam enfermidade no homem e animais (FIERER e GUINEY, 2001).

A maioria dos sorovares causa gastroenterite, enquanto sorovares específicos (Typhi, Paratyphi A e C e Sendai) causam febre entérica e alguns sorovares não

tifóides, como Choleraesuis e Dublin, causam bacteremia em preferência à diarreia. Da mesma forma, algumas salmonelas são completamente adaptadas ao hospedeiro (como Typhi e Pullorum para humanos e aves, respectivamente) ou altamente adaptadas, como Choleraesuis, Abortusovis e Dublin, para suínos, ovinos e bovinos, respectivamente (FIERER e GUINEY, 2001).

Em função da sua capacidade de disseminação no meio ambiente, esta bactéria pode ser isolada de locais variados, como água doce superficial e carne de animais, e conseqüentemente, de diversas matérias-primas alimentares. Pode ainda, ser veiculada pelo próprio homem, neste caso na condição de portador assintomático (JAKABI et al., 1999).

Membros do gênero *Salmonella* são um grupo morfológico e bioquimicamente homogêneo de bacilos gram-negativos, não produtores de esporos, facultativamente anaeróbios e móveis, com exceção da *S. Galinarum* e *S. Pullorum* (WILCOCK e SCHWARTZ, 1993). Geralmente não fermentam a lactose ou o fazem lentamente (CLARKE e GYLES, 1993). Bioquimicamente, são indol negativas, produzem ácido sulfídrico ( $H_2S$ ) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A uréia não é hidrolisada e são capazes de descarboxilar lisina e ornitina (HOLT et al., 1994).

As salmonelas desenvolvem-se numa faixa de crescimento de 7°C a 45°C e pH entre 4,5 e 9,0, são resistentes à dessecação e ao congelamento, possuindo a capacidade de sobreviver no ambiente por anos (TORTORA et al., 1993; WILCOCK e SCHWARTZ, 1993). Porém, é bastante sensível à luz solar e à maioria dos desinfetantes como fenóis, clorados e iodados (SOBESTIANSKY et al., 1999).

## 2.2 IMPORTÂNCIA DA *Salmonella* sp. EM SAÚDE PÚBLICA

As salmonelas são reconhecidas como uma das principais causas mundiais de toxinfecção alimentar. Geralmente, os surtos em humanos estão associados a produtos de origem animal. Nestes, os sintomas iniciais da doença são náuseas e vômitos, que ocorrem de oito a 24 horas após a ingestão do alimento contaminado e, geralmente não persistem após o início da diarreia. Alguns sorovares de *Salmonella* podem penetrar e ganhar acesso à corrente sangüínea, causando bacteremia (ATLAS, 1997), entretanto as infecções apresentam maior tendência de permanecerem localizadas.

A salmonelose não-tifoide vem aumentando gradativamente na população humana. Um dos fatores que contribui para a disseminação é o aumento do consumo de produtos alimentares de origem animal. Os suínos reconhecidamente funcionam epidemiologicamente como portadores hígidos desse microrganismo e conseqüentemente, como fonte de infecção para humanos (ZEBRAL et al., 1974).

O risco de surto de *Salmonella* sp. em humanos, tendo origem na carne suína, está presente, uma vez que lingüiça defumada e outros produtos não sofrem um estágio de eliminação do microrganismo, dependendo de sua completa ausência no material cru. Linfonodos submandibulares e as tonsilas, permanecem na carcaça após o abate. Estes, juntamente com músculos desta região, são aproveitados como “ligas” para embutidos e para produção de carnes mecanicamente separadas, e são comprovadamente carreadores do microrganismo (CASTAGNA et al., 2004).

Pela legislação brasileira, *Salmonella* sp. tem que estar ausente em 25g da amostra de alimento (ANVISA, 2001). Entretanto, existe uma quantidade mínima

necessária do microrganismo para a ocorrência de doença em humanos. Esta quantidade, ou dose infectante, pode variar em função do sorovar e da afinidade dos mesmos a determinadas espécies animais (JAKABI et al., 1999).

No Brasil, existem poucos dados oficiais sobre toxinfecções alimentares causadas por *Salmonella*. Entre o período de 1997-1999 foram investigados 323 surtos, no estado do Rio Grande do Sul, destes 116 (35,7%) foram causados por este patógeno (COSTALUNGA e TONDO, 2002). Em 2000, dos 99 surtos de toxinfecções ocorridos no mesmo estado 74 (74,7%) foram ocasionados por *Salmonella* sp., sendo apenas um associado a derivados suínos (NADVORNY et al., 2004).

Os métodos de cocção utilizados para a carne suína e seus produtos devem ser eficientes a fim de destruir a *Salmonella* na profundidade da carne. A contaminação cruzada, a falta de higiene na preparação do alimento e a estocagem inadequada são fatores de risco envolvidos com a infecção alimentar, permitindo que o microrganismo se multiplique até atingir doses infectantes (SOJKA e GITTER, 1961). Por outro lado, a presença de *Salmonella* sp. em produtos de origem animal tornam-no impróprio para o consumo. Os níveis de produtos contaminados variam de acordo com a região e as condições obedecidas durante o processamento do produto. Bactérias patogênicas em carne podem ser perigosas para consumidores se esta não for bem cozida ou se ocorrer contaminação cruzada de produtos crus para cozidos ou consumidos crus. Tal problema ocorre freqüentemente na casa do consumidor e em estabelecimentos comerciais (ESCARTÍN et al., 2000).

### 2.3 CONTAMINAÇÃO DE PRODUTOS FRESCAIS SUÍNOS POR *Salmonella* sp.

A contaminação da carne por microrganismos pode ocorrer de fonte endógena ou exógena (STRAPAZZON, 1997). A primeira forma é causada por microrganismos que já estão presentes no tecidos do próprio animal. O grau desta contaminação pode ser diminuído pela utilização de técnicas e práticas adequadas de sangria, refrigeração das carcaças, pela boa origem dos animais e um bom preparo destes animais antes do abate. Já a contaminação exógena é causada por microrganismos existentes no ambiente ou nos manipuladores da carne. Para reduzir os níveis deste tipo de contaminação é preciso de uma boa limpeza das instalações, máquinas, mesas e ferramentas, assim como uma rigorosa disciplina quanto à higiene dos manipuladores (STRAPAZZON, 1997).

A presença de *Salmonella* sp. em produtos suínos já tem sido relatada em vários países. Nas décadas de 50 e 60, nos Estados Unidos, foram encontradas altas porcentagens de lingüiças de carne de porco fresca positiva para *Salmonella* sp. (GALTON et al., 1954; RICHARDSON et al., 1960). O mesmo foi observado, posteriormente, na Inglaterra e Nigéria (ROBERTS et al., 1975; OYEKOLE e HASSAN, 1984).

Mais recentemente, na Alemanha, num estudo avaliando a presença de *Salmonella* sp. em carne suína moída, foi encontrada uma prevalência de 75,3% (SINELL et al., 1990). No México, Bello-Pérez (1993) verificou que de 9322 amostras de alimentos, 30% das lingüiças apresentavam este agente. Da mesma forma, Kuri et al. (1995), no mesmo país, encontraram, 78% (38/50) da carne crua de porco, 20% de lingüiça fresca fermentada (*chorizo*) de agroindústrias e 72% de *chorizo*

produzidos por açougues positivos. De 565 amostras de produtos suínos italianos, 58 (9,7%) estavam contaminadas por *Salmonella* sp., sendo 17,6% (40/227) de lingüiça frescal (GIOVANNINI et al., 2003).

No Brasil, em Curitiba, foram pesquisados 744 amostras de alimentos de origem animal (116 suína, 83 bovina e 545 aviária) e encontrados 12 isolados de *Salmonella*, todos do sorotipo Typhimurium. Os produtos de origem suína foram os de maior ocorrência, chegando a 13,31% em amostras de fígado e a 2% em lingüiça (GALARDA et al., 1999). Porém, Chaves et al. (2000), no Rio de Janeiro, encontraram 10% das amostras de lingüiça frescal de origem suína positivas para *Salmonella* sp, enquanto que Lobo et al. (2001) encontraram 5% de salames coloniais positivos no Rio Grande do Sul. Já em Cuiabá, o índice foi um pouco mais elevado 35,3% das lingüiças frescas encontravam-se contaminadas (REIS et al., 1995).

Os embutidos são apontados como importante fonte do microrganismo por serem preparados com carne fresca de bovinos e suínos, ou devido ao fato de que as mesmas não passam pelo processo de cocção (ROBERTS et al., 1975; BELLO-PÉREZ, 1993). A maior contaminação de lingüiça em relação à carne fresca deve-se a contaminação durante o preparo e o crescimento durante a manufatura e estoque (GIOVANNINI et al., 2003). Além disso, trabalhos recentes comprovam a relação entre a presença de *Salmonella* sp. nos linfonodos submandibulares e tonsilas, que ficam agregados à massa de embutidos, e no conteúdo intestinal de suínos ao abate com o isolamento de microorganismos no produto final (CASTAGNA et al., 2004).

São poucos os estudos que levam em consideração o nível de contaminação. Na Alemanha, Sinell et al. (1990) encontraram 1-99, 10-99, 100-999, 1000-9999 e > 10000 NMP/g (número mais provável por grama) em, respectivamente, 47%, 42%,

7%, 3% e 1% das amostras de produtos cárneos suínos analisados. Na Itália, os níveis também foram baixos, todas as amostras encontravam com NMP/g menores que  $10^3$  (GIOVANNINI et al., 2003).

Em todos estes trabalhos sempre foi encontrada uma grande diversidade de sorovares, sendo os mais freqüentes Typhimurium, Derby, Bredeney e Agona. Essa diversidade de sorovares indica a conservação inadequada e manutenção em condições que favorecem contaminação cruzada desde o abatedouro até os estabelecimento comercial (ESCARTÍN et al., 1995; ESCARTÍN et al., 2000).

### **3 DESENVOLVIMENTO**

**PREVALÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE SOROVARES DE *Salmonella* sp.  
ISOLADOS DE LINGÜIÇAS TIPO FRESCAL SUÍNA EM LAGES, SANTA  
CATARINA**

Artigo a ser submetido para publicação na Revista Ciência Rural

**Prevalência e quantificação de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiças tipo frescal suína em Lages, Santa Catarina**

**Prevalence and quantification of *Salmonella* serovars isolated from fresh pork sausage in Lages County, Santa Catarina State**

Denis Augusto Spricigo<sup>1</sup>, Suzana Ribeiro Matsumoto<sup>2</sup>, Sandra Maria Ferraz<sup>2</sup>

**RESUMO**

A *Salmonella* sp. é uma das principais causas mundiais de toxinfecção alimentar. Nos últimos anos, as preocupações tem se voltado para a carne e produtos suínos tanto no aspecto de saúde pública como de comercialização/exportação. Com isso, o objetivo do presente estudo foi verificar a prevalência de sorovares de *Salmonella* em lingüiças tipo frescal de matéria-prima suína, comercializadas em Lages/SC, bem como seu nível de contaminação. Para tanto, foram coletadas 200 amostras de nove marcas em diferentes estabelecimentos comerciais. No laboratório, foram pesados assepticamente 25 g de cada material coletado. Cada amostra foi submetida a pré-enriquecimento em água peptonada tamponada (37°C/24h), seguido de enriquecimento seletivo em Tetracionato Muller-Kauffmann e Rappaport-Vassiliadis (42°C/24h) e isolamento em agar seletivo Xilose Lisina Tergitol-4 e Verde Brilhante Lactose Sacarose acrescido de Novobiocina. Colônias suspeitas foram identificadas através de perfil bioquímico e sorologia. Das amostras analisadas foram isoladas *Salmonella* sp. em 27% (54), sendo o sorovar Typhimurium o mais encontrado (20%) num total de 15 sorovares. Apenas uma amostra apresentou uma quantidade de microrganismo capaz de causar enfermidade no

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Tecnologia (DMVTP), Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, Santa Catarina, Brasil. Laboratório de Microbiologia Veterinária. Av. Luís de Camões, 2090. CEP 88520-000 Lages, SC. E-mail: denispricigo@bol.com.br. Autor para correspondência.

<sup>2</sup> DMVPT, CAV, UDESC, Lages, Santa Catarina, Brasil.

homem ( $>1.100$  NMP/g). Apesar da maioria dos produtos positivos para *Salmonella* sp. conter uma quantidade de microrganismo abaixo da dose infectante, sua prevalência elevada pode representar um risco ao consumidor.

**Palavras-chave:** *Salmonella* sp., lingüiça frescal suína, quantificação

### ABSTRACT

*Salmonella* is one of the main causes of food poisoning. In the last years, the main focus has been on meat and swine products both because of public health concerns and also because of its commercialization/exportation. Therefore, the aim of this study is to check the prevalence of *Salmonella* serovars in fresh pork sausages commercialized in Lages, Santa Catarina and analyze its level of contamination. For this purpose, 200 samples of nine brands were collected from different commercial stores. In the laboratory 25 grs of the collected material was weighed aseptically. Each sample was submitted to a pre-test in filtered water (37°C/24 h) followed by selective tests into Tetrathionate Muller-Kauffmann and Rappaport-Vassiliadis (42°C/24h) and isolated in Xylose Lysine Tergitol-4 agar and Brilliant-Phenolred-bile-Lactose-Saccharose agar added with Novobiocine. Suspected colonies were confirmed by biochemical and sero tests. In the samples analyzed, *Salmonella* sp. 27 (54) was isolated, having serovar Typhimurium (20%) the highest percentage of occurrence in a total of 15 serovars. Just one sample showed a quantity of microorganism capable of causing diseases in human beings ( $>1.100$  MPN/g). Although most products were positive for *Salmonella* sp., and in spite of the fact that they contained microorganisms below the infected dose, their prevalence may be a risk for the consumer.

**Keywords:** *Salmonella* sp., pork fresh sausage, quantification

## INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, as aves e seus produtos assumiram maior importância como fonte de infecção por *Salmonella enterica* para humanos (BAGGESEN & WEGENER, 1994; OLSEN et al., 1992). Porém, nos últimos anos, os suínos e seus derivados vêm crescendo com destaque nos casos de salmonelose transmitida por produtos de origem animal. Em países desenvolvidos, a carne suína já é responsável por 5-30% dos casos (BERENDS et al., 1998).

A crescente demanda de derivados suínos tipo frescal, representa um aumento do risco destes produtos participarem de surtos de salmonelose em humanos (CASTAGNA et al., 2004). Dentre os derivados, a lingüiça apresenta um maior risco, pois pode ocorrer contaminação e proliferação dos microorganismos, durante o preparo, manufatura e estoque do produto (GIOVANNINI et al., 2004). Além disso, trabalhos recentes comprovaram a relação entre a presença de *Salmonella* sp. nos linfonodos submandibulares e tonsilas, que ficam agregados à massa de embutidos, e no conteúdo intestinal de suínos ao abate com o isolamento de microorganismos no produto final (CASTAGNA et al., 2004).

Geralmente, somente é pesquisada a presença de *Salmonella* sp. nos alimentos, não levando em consideração a quantidade do patógeno. Esta característica determina, juntamente com a condição de saúde do indivíduo, o risco da infecção. No Brasil, apenas os estados do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Paraná, apresentam algum tipo de análise de prevalência de *Salmonella* sp. em produtos cárneos de origem suína (CHAVES et al., 2000; LOGUERCIO et al., 2002; REIS et al., 1995; GALARDA et al., 1999). Apesar da importância dos frigoríficos catarinenses na produção e exportação destes produtos, existe apenas um estudo prévio com baixa amostragem determinando a prevalência e sorovares do microorganismo em embutidos frescais suínos (MATSUMOTO et al., 2005). Com isso, o objetivo deste trabalho foi analisar um maior número de amostras de lingüiças tipo frescal suína comercializadas no município de Lages/SC para a determinação de prevalência,

sorovares e nível de contaminação por *Salmonella* sp.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas aleatoriamente, em 10 diferentes estabelecimentos, 200 amostras de lingüiça tipo frescal suína, de nove marcas distintas sob inspeção federal oferecidas no comércio de Lages/SC, no período de setembro de 2005 a abril de 2006. O cálculo do número de amostras foi realizado segundo Sampaio (2000) com intervalo de confiança de 95% e frequência esperada de 12,6% (MATSUMOTO et al., 2005), sendo encontrada a necessidade de um mínimo de 170 amostras.

As amostras eram adquiridas em embalagens fechadas ou a granel. O número por marca e local não foi homogêneo devido às diferentes disponibilidades no comércio. No laboratório, as amostras foram mantidas refrigeradas (4<sup>o</sup> C) até serem realizados todos os processamentos (isolamento e quantificação). A metodologia utilizada para o isolamento de *Salmonella* sp. seguiu o descrito por Michael et al. (2003). As colônias suspeitas foram identificadas através de suas características morfológicas e bioquímicas, conforme metodologia de rotina (HOLT, 1994), e após foram confirmadas como *Salmonella* sp. através de soroaglutinação\*. De cada amostra foram encaminhadas duas a três colônias do isolamento à Fundação Instituto Oswaldo Cruz (RJ) para a sorotipificação. A quantificação deste microrganismo foi realizada em todas as amostras positivas para *Salmonella* através de metodologia descrita por Escartín et al. apud Borowsky (2005).

As análises estatísticas foram realizadas através do teste Qui-quadrado com nível de significância de 0,05 do pacote estatístico SAS (1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

\* Soro *Salmonella* Polivalente, PROBAC, São Paulo, Brasil

As amostras de lingüiça frescal suína, analisadas neste trabalho, apresentaram uma prevalência de *Salmonella* sp. de 27%. Este índice é mais elevado do que foi observado em estudo prévio (12,5%) conduzido na mesma região (MATSUMOTO et al., 2005). Apenas em uma das marcas testadas (C) não foi encontrado o microrganismo. A marca B, uma das mais disponíveis no comércio e, provavelmente, uma das mais consumidas, apresentou 40,5% de positividade (Tabela 1).

No Brasil, em estudos sobre a presença *Salmonella* sp. em produtos frescos suínos foram encontradas frequências menores, como no Paraná (2%), no Rio de Janeiro (10%) e no Rio Grande do Sul (11,82%) (GALARDA et al., 1999, CHAVES et al., 2000; LOGUERCIO et al., 2002). Por outro lado, no Mato Grosso, foi encontrada uma prevalência de 35,3% em lingüiças frescas (REIS et al., 1995). Estudos recentes, realizados no Rio Grande do Sul, encontraram 93,94% de amostras de massa para embutidos contaminadas por *Salmonella* sp. (CASTAGNA et al., 2004). A diferença nestas frequências pode estar relacionada a vários fatores, como diferentes metodologias utilizadas para o isolamento e a própria região.

Estatisticamente, não houve diferença significativa na prevalência de *Salmonella* sp. entre as marcas analisadas ( $p=0,1134$ ), locais de compra ( $p=0,3421$ ) e produtos comercializados em embalagens fechadas e a granel ( $p=0,1413$ ). Para a primeira análise foi excluída a marca C, pois esta não apresentou nenhuma amostra positiva. Devido ao número de amostras, para a comparação entre frequências de fechadas e a granel, somente foram utilizadas aquelas que se encontravam nas duas apresentações em número significativo (A, F e G), realizando-se o mesmo para o local (A, B e G).

Como não foi constatada diferença entre as duas apresentações do produto e diferentes estabelecimentos comerciais, provavelmente a maior parte da contaminação teve origem no frigorífico ou na granja. Em um estudo conduzido na Holanda, a baia de espera foi considerada a fonte de contaminação mais importante para os animais oriundos de rebanhos

soronegativos, enquanto que a granja contribuiu mais com a contaminação de carcaças de suínos provenientes de rebanhos soropositivos (SWANENBURG et al., 2001).

Com o objetivo de determinar se a composição da lingüiça influenciou na prevalência do microrganismo, as lingüiças foram agrupadas em lombo/pernil e toscana/outras. Da mesma forma que nas análises anteriores, devido ao número de amostras, somente foram consideradas as marcas que apresentavam os dois grupos em número suficiente (marcas A, B e E). Foi encontrada diferença significativa ( $p=0,05$ ) que pode ser explicada pela menor possibilidade de contaminação das partes nobres dos suínos por dois motivos básicos: encontram-se mais elevadas na carcaça suspensa, dificultando a contaminação por extravasamento de conteúdo intestinal, e principalmente por serem menos manipuladas. Porém, para a confirmação desta hipótese seria necessária a realização de uma maior amostragem de produtos de mesma marca e composição distinta.

No estudo ainda foi encontrada uma grande diversidade de sorovares (13), tanto em amostras de diferentes como de mesmas marcas. No entanto, em apenas seis amostras (B3, B6, E1, E3, E6 e G7) foram identificados mais de um sorovar (Tabela 2). Escartín et al. (2000) encontraram uma diversidade semelhante de *Salmonella* sp. isoladas de carne suína crua. Isto pode ocorrer devido a diferentes origens de contaminação, relacionados tanto com os sorovares presentes nos lotes, quanto com possíveis contaminações cruzadas durante o processamento (CASTAGNA et al., 2004).

Assim como em outros estudos com produtos de origem animal (CASTAGNA et al., 2004; GIOVANNINI et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2005), entre os sorovares mais encontrados estavam Typhimurium (12/60 - 20%) e Derby (11/60 -18,33%). Apesar de todos os sorovares de *Salmonella* sp. serem considerados potencialmente patogênicos para humanos, a maioria dos surtos têm sido relacionados com maior frequência aos sorovares Enteritidis e Typhimurium. No Brasil, os sorovares Typhimurium, Agona, Infantis e

Enteritidis foram identificados em casos de infecção alimentar em humanos, sendo que, nos últimos anos, o sorovar Enteritidis tem sido o mais encontrado (TAUNAY et al., 1996; ESPER et al., 1998; JAKABI et al., 1997).

Apenas uma das amostras (D5; >1.100 NMP/g) apresentou uma contagem de microrganismo acima da dose infectante (Tabela 2). A dose resposta para a infecção por *Salmonella* do grupo não-tifóide em humanos saudáveis é de  $10^5$  a  $10^{10}$ , apesar de existirem registros de surtos com doses menores que  $10^3$  (BLASER & NEWMAN, 1982). Independentemente da quantidade do microrganismo encontrada no alimento, a legislação brasileira requer a ausência deste patógeno em 25g de amostra analisada (ANVISA, 2001).

No país, somente existe um estudo de quantificação deste patógeno em produtos suínos, no qual, em massas para embutidos, foram encontradas quantidades baixas (<150 NMP/g) de *Salmonella* sp. (CASTAGNA et al., 2004). Porém, é preciso considerar que a estocagem inadequada pode permitir a multiplicação do microrganismo e este atingir a dose infectante (SOJKA & GITTER, 1961). Além disso, o risco de surtos pode estar relacionado a alimentos crus contaminados por embutidos frescos, no momento do preparo, e não propriamente por estes, que geralmente são tratados pelo calor antes do consumo (ESCARTÍN et al., 2000; GORMAN et al., 2002).

Apesar das linguiças tipo frescal suína disponíveis a população de Lages apresentarem níveis de contaminação por *Salmonella* sp. baixos, é preocupante o fato de praticamente todas as marcas analisadas apresentarem prevalências elevadas deste patógeno. Este problema, além de ser um risco a saúde pública, pode criar entraves a comercialização dos produtos para países que apresentam controle do microrganismo. Com isso, faz-se necessária a implementação de um programa nacional de controle de *Salmonella* sp. e, para tanto, mais estudos são necessários em Santa Catarina e em outros estados produtores contemplando outras etapas da cadeia suinícola.

## CONCLUSÕES

As lingüiças tipo frescais de carne suína disponíveis no comércio de Lages, Santa Catarina, apresentam uma prevalência de 27% de isolamento de *Salmonella* sp. Além disso, a quantificação de *Salmonella* sp. em amostras positivas demonstrou que o nível de contaminação encontrou-se na maioria dos casos abaixo da dose considerada infectante.

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Eliane Falavina dos Reis, Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz (RJ), pela sorotipificação das amostras. Ao Professor Sérgio Dallagnol, Laboratório de Patologia Aviária-CAV/UEDESC, pelo auxílio na realização deste trabalho. E ao Professor André Thaler Neto, pela análise estatística.

## REFERÊNCIAS

ANVISA. *Resolução –RDC no12, de 02 de janeiro de 2001*. Capturado em 20 nov. 2006. Online. Disponível na Internet <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>.

BERENDS, B.R. et al. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, n.3, p.219-229, 1998.

BAGGESEN, D.L.; WEGENER, H.C. Phage types of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from production animals and humans in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.35, n.4, p.349-354, 1994.

BLASER, M.J.; NEWMAN, L.S. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. **Journal of Infections Diseases**, v.4, p.1096-1106, 1982.

BOROWSKY, L.M. **Comparação de dois métodos de quantificação de *Salmonella* sp. em embutidos suínos**. 2005. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bacteriologia)-Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Porto Alegre, 2005.

CASTAGNA, S.M.F. et al. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.2, p.141-147, 2004.

CHAVES, G.M.C. et al. Avaliação bacteriológica de lingüiça frescal suína comercializada no município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, v.14, n.74, 2000.

ESCARTÍN, E.F. et al. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. **International Journal of Food Microbiology**, v.54, p.19-25, 2000.

ESPER, M.R.N.R., et al. *Salmonella*: Sorotipos identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.57, p.45-50, 1998.

GALARDA, I. et al. Pesquisa de *Salmonella* em produtos alimentares de origem animal. **Boletim CEPPA**, v.9, n.2, p.170-177, 1999.

GIOVANNINI, A. et al. Quantative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an italian region. **Food Control**, v.15, p.139-144, 2004.

GORMAN, R. et al. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.143-150, 2002.

HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. New York: Williams & Wilkims, 1994, 787 p.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.47-51, 1999.

LOGUERCIO, A.P. et al. ELISA indireto na detecção de *Salmonella* spp. em lingüiça suína. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.1057-1062, 2002.

MATSUMOTO, S.R. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp. em lingüiça tipo frescal de matéria-prima suína disponível à população de Lages/SC. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA, 12, 2006, Lages. **Anais...** Lages, 2006. p. 124.

MICHAEL, G. et al. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 138-142, 2003.

OLSEN, J.E et al. Plasmid profiles as an epidemiological marker in *Salmonella enterica* serovar *berta* infections. Comparison of isolates obtained from humans and poultry. **APMIS**, v.100, n.3, p.221-228, 1992.

REIS, R.B. et al. *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá- MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.15, n.1, p.74-78, 1995.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p. Cap. 12: Estudo de dispersão de freqüência, p. 107-121.

SAS INSTITUTE (CARY NC). **SAS User Guide: Statical Analysis System**, release 8.2, 1999.

SCHLOSSER, W. et al. Analysis of *Salmonella* serotypes from selected carcasses and raw ground products sampled prior to implementation of the pathogen reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point final rule in the US. **International Journal of Food Microbiology**, v.58, p.107-111, 2000.

SOJKA, W.J.; GITTER, M. Salmonellosis in pigs with reference to its public health significance. **Veterinary Reviews and Annotations**, v.7, p.11-28, 1961.

SWANENBURG, M.; BERENDS, B. R.; URLINGS, H. A. P. et al. Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 114, p. 356-359, 2001.

TAUNAY, A.E. et al. The role of public health laboratory in the problem of Salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, p.119-127, 1996.

Tabela 1.1 – Número de amostras positivas e frequência de *Salmonella* sp. em lingüiças tipo frescal suína de diferentes marcas comercializadas em Lages/SC.

Marca	Positivas			Total			Frequência (%)
	Fechadas	A granel	Total	Fechadas	A granel	Total	
A	1	10	11	8	53	61	18,0
B	1	16	17	1	41	42	40,5
C	0	0	0	9	0	9	0
D	5	0	5	11	0	11	45,4
E	7	0	7	17	0	17	41,2
F	2	2	4	8	2	10	40,0
G	4	2	6	6	25	31	19,3
H	0	2	2	0	10	10	20,0
I	2	0	2	9	0	9	22,2
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>32</b>	<b>54</b>	<b>69</b>	<b>131</b>	<b>200</b>	<b>27</b>

Tabela 1.2 – Amostras de lingüiça tipo frescal suína positivas para *Salmonella* sp. com seus respectivos sorovares e Número Mais Provável por Grama (NMP/g).

<b>Amostra</b>	<b>Sorovar</b>	<b>NMP/g</b>	<b>Amostra</b>	<b>Sorovar</b>	<b>NMP/g</b>
A1	Schwarzengrund	3,6	D1	Typhimurium	9,2
A2	Schwarzengrund	<3,0	D2	Panama	15
A3	Schwarzengrund	43	D3	Derby	93
A4	Heidelberg	<3,0	D4	Typhimurium	<3,0
A5	Derby	9,2	D5	Typhimurium	>1.100
A6	Derby	<3,0	E1	(O3,10:h:-)	3,6
A7	Derby	93	E1	Brandenburg	
A8	Typhimurium	3,6	E2	Brandenburg	120
A9	Bredeney	<3,0	E3	(O3,10:h:-)	20
A10	Agona	<3,0	E3	London	
A11	Typhimurium	9,2	E4	Derby	<3,0
B1	Brandenburg	<3,0	E5	Rissen	460
B2	Panama	<3,0	E6	Rissen	21
B3	Brandenburg	<3,0	E6	Typhimurium	
B3	Infantis		E7	Derby	23
B4	Cerro	<3,0	F1	(O:6,8)	3,6
B5	Schwarzengrund	<3,0	F2	Panama	<3,0
B6	Agona	<3,0	F3	Anatum	3,6
B6	Derby		F4	Anatum	3,6
B7	Brandenburg	11	G5	Brandenburg	15
B8	Derby	3,6	G6	Infantis	3,6
B9	Typhimurium	9,4	G7	Rugosa	3,6
B10	Infantis	<3,0	G7	Typhimurium	
B11	Infantis	<3,0	G8	Typhimurium	<3,0
B12	Agona	<3,0	G9	Typhimurium	<3,0
B13	Bredeney	<3,0	G10	Infantis	<3,0
B14	Typhimurium	<3,0	H1	Schwarzengrund	<3,0
B15	Typhimurium	21	H2	Panama	<3,0
B16	Derby	43	I3	Derby	<3,0
B17	(O4,5)	<3,0	I4	Derby	<3,0

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM SOROVARES DE *Salmonella*  
ISOLADOS DE LINGÜIÇAS TIPO FRESCAL SUÍNA EM LAGES, SANTA  
CATARINA**

Artigo a ser submetido para publicação

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM SOROVARES DE *Salmonella*  
ISOLADOS DE LINGÜIÇAS TIPO FRESCAL SUÍNA EM LAGES, SANTA  
CATARINA**

**RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL DRUGS IN *Salmonella* SEROVARS STRAINS  
ISOLATED FROM FRESH PORK SAUSAGE IN LAGES, SANTA CATARINA  
STATE**

SPRICIGO, D.A<sup>1</sup>, ESPÍNDOLA, M.L.<sup>1</sup>, FERRAZ, S.M.<sup>1</sup>

**RESUMO**

O monitoramento da resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* sp., provenientes de derivados de carne suína, é essencial devido a crescente importância destes produtos como possíveis fontes de contaminação para humanos. Com isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de resistência antimicrobiana de 60 amostras de *Salmonella* sp. isoladas de lingüiças frescas suínas comercializadas no município de Lages, Santa Catarina. Foi utilizado o método de difusão em agar Mueller-Hinton para testar 15 diferentes sorovares contra 14 antimicrobianos. Das amostras analisadas, 56,67% apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados e 20% com perfil de multi-resistência. Os maiores níveis de resistência foram apresentados pela sulfonamida (45%) e tetraciclina (41,67%). Nenhuma amostra foi resistente a amoxicilina/ácido clavulânico, cefaclor, gentamicina, neomicina e tobramicina. A

---

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária e Tecnologia. Centro de Ciências Agroveterinárias. Universidade do Estado de Santa Catarina. Av. Luiz de Camões 2090 CEP 88520-050 Conta Dinheiro – Lages (SC). denispricigo@bol.com.br.

amostra que apresentou resistência a um maior número de antimicrobianos (7/14) foi do sorovar Schwarzengrund, porém o sorovar Typhimurium foi o que apresentou maior número de isolados multi-resistentes (5/12 – 41,67%). O alto número de isolados resistentes encontrado no presente estudo indica a necessidade de futuro monitoramento do uso de antimicrobianos na granja, para controlar o risco de seleção e transmissão de linhagens resistentes através da cadeia alimentar.

**Palavras-chave:** *Salmonella*, lingüiça frescal suína, resistência antimicrobiana, multi-resistência.

#### ABSTRACT

The monitoring of the resistance to antimicrobial agents isolated of *Salmonella* sp., originated from swine products is essential owing to the growing importance that products of swine origin may have as possible sources of contamination for human beings. Therefore, the aim of this study was to determine the profile of antimicrobial resistance to 60 samples of *Salmonella* sp. Isolated in fresh pork sausages commercialized in the district of Lages, Santa Catarina. The method of diffusion in Mueller-Hinton agar was used to test 15 different serovars against 14 antimicrobial agents. 56,67% of the analyzed samples showed resistance to at least one antimicrobial agent, and 20% showed multi-resistance. The highest levels of resistance were shown by sulfonamide (45%) and tetracycline (41%). No sample was resistant to amoxicillin/clavulanic acid, ceflacor, gentamicin, neomycin and tobramycin. The sample that showed resistance to the highest number of antimicrobial agents (7/14) belongs to serovar Schwarzengrund, although serovar Typhimurium presented the highest number of multiresistant isolated agents (5/12 –

41,67%). The high number of isolated agents found in the study stresses that future monitoring of the use of antimicrobial agents is necessary to control the risk of selection and transmission of resistant families through the feeding process.

**Keywords:** *Salmonella* sp., fresh pork sausage, antimicrobial resistance, multiresistance.

## INTRODUÇÃO

Os suínos são reservatórios potenciais de algumas bactérias que causam infecções no homem, incluindo a *Salmonella* sp. Embora o contato direto seja uma forma de transmissão deste patógeno em granjas e abatedouros, são os alimentos contaminados que apresentam o papel mais importante na infecção humana. O risco da infecção por salmonela ocorre quando a carcaça é contaminada no abate e há falha na remoção ou eliminação do microrganismo durante o processamento e tratamento térmico do produto, tanto na indústria como por parte do consumidor (McEWEN, 2006). No Brasil, a ocorrência de *Salmonella* sp. em suínos e produtos de origem suína vem sendo pesquisada ao longo dos anos (MATSUMOTO et al., 2005; CASTAGNA, 2004; BANDEIRA et al., 2003; LOGUERCIO et al., 2002; CHAVES et al., 2000; REIS et al., 1995; GALARDA et al., 1991).

A salmonelose em humanos é caracterizada primariamente por uma gastroenterite, não requerendo, na maioria das vezes, o tratamento com antimicrobianos. Porém, este é essencial em febre entérica, salmonelose invasiva e pacientes com risco de doença extraintestinal, principalmente em crianças e portadores do vírus da imunodeficiência humana (PARRY, 2003).

Desde o início dos anos 90, tem ocorrido um aumento drástico na resistência

da *Salmonella enterica* aos antimicrobianos. Isto tem sido atribuído ao uso destes na profilaxia e terapêutica de animais produtores de alimento (THRELFALL et al., 2000). Desta forma, o uso indiscriminado de antimicrobianos pode conduzir à seleção de linhagens resistentes (BAHNSON e FEDORKA-CRAY, 1999) que chegam a população através dos alimentos de origem animal.

A crescente importância de produtos suínos frescos como possíveis fontes de contaminação por *Salmonella* sp. para humanos, justifica o monitoramento da resistência a antimicrobianos em isolados deste microrganismo. Com isso, o objetivo deste trabalho foi de identificar o perfil de resistência de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça fresca suína comercializadas em Lages/SC.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, foram utilizadas 60 cepas de *Salmonella* sp. isoladas de lingüiças tipo fresca suína comercializadas em Lages/SC. Estas pertenciam aos seguintes sorovares: Agona (3), Anatum (2), Brandenburg (6), Bredeney (2), Cerro (1), Derby (11), Heidelberg (1), Infantis (5), London (1), Panama (4), Rissen (2), Schwarzengrund (5), Typhimurium (12) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (5).

O teste de susceptibilidade *in vitro* foi realizado pelo método da difusão em agar Mueller-Hinton (NCCLS, 2001), utilizando os seguintes discos de antimicrobianos\*: ácido nalidíxico (An-30µg), amicacina (Am-30µg), amoxicilina/ácido clavulânico (Ac-20/10µg), ampicilina (Ap-10µg), cefaclor (Cf-30µg), ciprofloxacina (Ci-5µg), cloranfenicol (Cl-30µg), cotrimoxazol (St-5µg), estreptomicina (Es-10µg), gentamicina (Ge-10µg), neomicina (Ne-30µg), sulfonamida (SI-300µg), tetraciclina (Te-30µg) e tobramicina (Tb-10µg).

---

\* DME, Araçatuba, São Paulo, Brasil

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 60 isolados de *Salmonella* sp., 34 (56,67%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Além disso, 20% (12/60) apresentaram multi-resistência, ou seja, foram resistentes a quatro ou mais antimicrobianos. Castagna (2004) encontrou índices mais elevados em um estudo de perfil de resistência utilizando amostras provenientes de massa para embutidos tipo frescal suíno, no qual 77,17% das amostras apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano e 27,6%, perfil de multi-resistência.

Os maiores índices de resistência foram apresentados pela sulfonamida (45%) e tetraciclina (41,67%), enquanto nenhuma amostra foi resistente a amoxicilina/ácido clavulânico, cefaclor, gentamicina, neomicina e tobramicina (Tabela 1). Em um estudo realizado em Santa Catarina com 582 isolados de *Salmonella* sp. de granjas de terminação e frigorífico, a maior resistência foi frente a tetraciclina (78,9%) e, diferentemente do presente trabalho, encontrou-se um índice alto para a gentamicina (38%) (KICH et al., 2006).

Nenhuma das amostras do sorovar Infantis apresentaram resistência a qualquer um dos antimicrobianos. Este dado é importante, pois, num levantamento realizado por Taunay et al. (1996), este foi o quarto mais isolado, no período de 1950 a 1990, de amostras humanas.

O aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos tem sido associado a sua administração excessiva a animais criados para a produção de alimentos (CRUCHAGA et al., 2001; SCHWARZ e CHASLUS-DANCLA, 2001; TEUBER, 2001). Além disso, os maiores índices de resistência ocorrem contra antimicrobianos disponíveis há mais tempo no mercado e que são comumente utilizados na terapêutica (BAHNSON e FEDORKA-CRAY, 1999; FEDORKA-CRAY e BAHNSON

et al., 1999; HARVEY e FARRINGTON et al., 1999). Desta forma, o alto número de amostras resistentes à tetraciclina e à sulfonamida poderia ser explicado pelo uso freqüente destes antimicrobianos nos animais.

Um isolado do sorovar Schwarzengrund foi o que apresentou resistência ao maior número de antimicrobianos testados (7/14), com o perfil AnApCiCiStSITE. Porém, o sorovar Typhimurium foi o que apresentou maior número de isolados multi-resistentes (5/12 – 41,67%). Linhagens deste sorovar pertencentes ao fagotipo DT104 são considerados como de maior patogenicidade para humanos (BAGGESEN e AARESTRUP, 1998; NIELSEN et al., 1999), e tem se caracterizado, em diversos países, por um perfil de resistência contra ampicilina, tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol e sulfonamidas (THRELFALL et al., 1994). No presente trabalho, nenhum dos isolados de Typhimurium apresentou este padrão. No entanto, quatro apresentaram padrões semelhantes, três com CIEsSITE e um com ApCIEsTe.

Estas cepas multi-resistentes podem caracterizar um risco a saúde do consumidor. Surtos causados por elas podem representar uma barreira para o sucesso do tratamento, aumentando o custo deste e a mortalidade na população de risco. A antibioticoterapia não é necessária em casos usuais de salmonelose, entretanto nas infecções generalizadas e em pacientes de risco o tratamento precisa ser instituído (PARRY, 2003).

Apesar do perfil de resistência a antimicrobianos não ser considerado a melhor opção para demonstrar o grau de similaridade entre linhagens bacterianas, perfis idênticos dentro de um mesmo sorovar de salmonelas podem indicar a presença de clones (LIMPITAKIS et al., 1999). Neste estudo, foram encontrados 18 perfis de resistência. Poucos foram os casos de determinados sorovares apresentarem o mesmo perfil e, quando isto ocorreu, as amostras tinham origens

distintas. Seria necessária a realização de outras técnicas, como fagotipificação e eletroforese em campo pulsado, para uma melhor discriminação entre os isolados (BESSA, 2006).

Programas de monitoramento de resistência antimicrobiana já estão sendo conduzidos em vários países. Na Dinamarca, a preocupação com a segurança do consumidor resultou na implementação de um programa, cujos objetivos principais são o controle da resistência de bactérias isoladas de animais de produção e do risco da transmissão de patógenos resistentes para o homem através do alimento (MONNET et al., 2000). A resistência antimicrobiana está entre os desafios no controle da *Salmonella*, e a vigilância através de programas de monitoramento seria um dos mecanismos para o controle (CASTAGNA, 2004).

## CONCLUSÕES

Foi encontrado um alto número de isolados com multi-resistência a antimicrobianos, o que indica a necessidade de uma maior controle dos antimicrobianos utilizados na granja, para minimizar o risco de seleção e transmissão de linhagens resistentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGGESEN, D.L., AARESTRUP, F. Characterization of recently emerged multiple antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and other multiresistant phage types from Danish pig herds. *Veterinary Record*, n. 143, p.95-97, 1998.

BAHNSON, B.P., FEDORKA-CRAY, P.J. The association of antimicrobial resistance pattern and reported usage of antimicrobials in commercial growing pig production. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3., 1999, Washington. *Proceedings...* Washington, 1999. p.

240-241.

BANDEIRA, R.M., NADVORNY, A., COSTA, M., et al. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos ao abate e em cortes de pernil produzidos no Rio Grande do Sul. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS – ABRAVES, 2003. Goiânia, GO. *Anais...* Concórdia: Embrapa, 2003. 483 p. p. 71-72.

BESSA, M. C. *Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de Salmonella enterica sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul*. 2006. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CASTAGNA, S.M.F. *Associação da prevalência de suínos portadores de Salmonella sp. ao abate e a contaminação de embutidos tipo frescal*. Porto Alegre – RS. 2004. 110 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias na área de Bacteriologia) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

CHAVES, G.M.C., GONÇALVES, P.M.R., FRANCO, R.M. et al. Avaliação bacteriológica de lingüiça frescal suína comercializada no município do Rio de Janeiro, RJ. *Higiene Alimentar*, v.14, n.74, 2000.

CRUCHAGA, S., ECHEITA, A., ALADUEÑA, A. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.47, p.315-321, 2001.

FEDORKA-CRAY, P.J., BAHNSON, P.B., LADELY, S.R. Antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolates collected from slaughter age pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington. *Proceedings...*Washington, 1999. p. 245-247.

GALARDA, I., LIMA, M.L.P.S; MIKOSZEWSKA, I. et al. Pesquisa de *Salmonella* em produtos alimentares de origem animal. *Boletim CEPPA*, v. 9, n. 2, p. 170-177, 1999.

HARVEY, R.B., FARRINGTON, L.A., BUCKLEY, S.A. et al. Epidemiological survey of antimicrobial-resistant *Salmonella* in market-age swine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington. *Proceedings...*Washington, 1999. p. 252-256.

KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N. et al. Resistência antimicrobiana em isolados de *Salmonella* provenientes de granjas de terminação e frigorífico de Santa Catarina. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, 2006. p. 461-463.

LIMPITAKIS, N. et al. Antibiotic sensitivity profile of *Salmonella* isolated from two slaughterhouses and human clinical cases. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington, 1999. p. 257-260.

LOGUERCIO, A.P., ALEIXO, J.A.G., VARGAS, A.C. et al. ELISA indireto na detecção de *Salmonella* spp. em lingüiça suína. *Ciência Rural*, v. 32, n. 6, p. 1057-1062, 2002.

MATSUMOTO, S.R.; SPRICIGO, D. A.; ESPÍNDOLA, M. L. et al.. Pesquisa de *Salmonella* sp. em lingüiça tipo frescal de matéria-prima suína disponível à população de Lages/SC. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA, 12, 2006, Lages. *Anais...* Lages, 2006. p. 124.

MCEWEN, S.A. Food safety in relation to antibiotic resistance. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS VETERINARY, 19, 2006, Copenhagen. *Proceedings...* Copenhagen, 2006. p. 10-13.

MONNET, D.L., EMBORG, H.D., ANDERSEN, S.R. et al. Surveillance of antimicrobial resistance in Denmark. *European Communicable Disease Bulletin*, v.5, n.12, p. 129-132, 2000.

NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 11th informational supplement. Approved standard M2-A7 and M7-A5. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, PA, USA, 2001.

NIELSEN, B., MOGELMOSE, V., SORENSEN, L.L. et al. Tracing back multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 from pork at the slaughterhouse to a specific swine herd by strategical use of serology and culture. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington, 1999. p.261-263.

PARRY, C.M. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.16, p.467-472, 2003.

REIS, R.B., KRUGER, C.S., MACIEL, M.S. *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá- MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v. 15, n. 1, p. 74-78, 1995.

SCHWARZ, S., CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, v.32, p.201-225, 2001.

TAUNAY, A.E., FERNANDES, A.S., TAVECHIO, A.T. et al. The role of public health laboratory in the problem of Salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, p. 119-127, 1996.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, v.4, p.493-499, 2001.

THRELFALL, E.J., FROST, J.A., WARD, L.R. et al. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella* Typhimurium DT104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Veterinary Record*, n.134, p.577, 1994.

THRELFALL, E.J., WARD, L.R., FROST, J.A. et al. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.62, p.1-5, 2000.

Tabela 2.1 – Resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isoladas de lingüiças tipo fresco suína comercializadas em Lages/SC.

Sorovares	Número de amostras resistentes														
	N	AN	AC	AM	AP	CF	CI	CL	ES	GE	NE	SL	ST	TE	TB
Agona	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-
Anatum	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-
Brandenburg	6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	2	-
Bredeney	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cerro	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Derby	11	3	-	-	-	-	-	1	4	-	-	10	2	8	-
Heidelberg	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Infantis	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
London	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Panama	4	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-
Rissen	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Schwarzengrund	5	1	-	-	1	-	1	2	-	-	-	4	1	1	-
Typhimurium	12	3	-	1	3	-	-	4	3	-	-	6	2	10	-
<i>S. enterica</i>	5	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>11</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>27</b>	<b>7</b>	<b>25</b>	<b>-</b>

N: número de amostras por sorovar.

AN: ácido nalidíxico; AC: amoxicilina/ácido clavulânico; AM: amicacina; AP: ampicilina; CF: cefaclor; CI: ciprofloxacina; CL: cloranfenicol; ES: estreptomicina; GE: gentamicina; NE: neomicina; SL: sulfonamida; ST: cotrimoxazol; TE: tetraciclina; TB: tobramicina.

#### 4 DISCUSSÃO GERAL

A competição em novos mercados e o aumento do nível de exigência dos consumidores do mercado interno pressupõem a busca constante de qualidade da carne produzida. Dentro do conceito de qualidade, o aspecto sanitário tem importância fundamental e é uma barreira para a comercialização dos produtos no âmbito internacional.

Com a concentração da produção de alimentos e ampliação da distribuição para muitos países, a qualidade e segurança dos produtos é condição exigida pelo mercado e oferece vantagens competitivas para quem consegue atender. Dessa forma, a *Salmonella* sp. está rapidamente tornando-se uma preocupação crescente para a indústria suinícola mundial (DAVIES, 1997).

Esta preocupação é decorrente principalmente de seu difícil controle, já que a infecção dos rebanhos tende a ser um problema persistente nos sistemas de produção de suínos, uma vez que diversos fatores podem contribuir para a cadeia epidemiológica da *Salmonella* sp. (BLAHA, 2001).

A infecção do suíno pode ocorrer em diversas fases da cadeia produtiva, desde a granja até o processamento do produto final. Em um estudo conduzido na Holanda, a baia de espera foi considerada a fonte de infecção mais importante para os animais oriundos de rebanhos soronegativos, contribuindo com aproximadamente

75% das contaminações de carcaça. Por outro lado, a granja contribuiu com a contaminação de carcaças de suínos provenientes de rebanhos soropositivos (SWANENBURG et al., 2001). Além disso, já foi comprovada a relação entre a presença de *Salmonella* sp. nos linfonodos submandibulares e tonsilas, que ficam agregados à massa de embutidos, e no conteúdo intestinal de suínos ao abate com o isolamento de microrganismos no produto final (CASTAGNA et al., 2004).

Na região sul do Brasil, vários estudos bacteriológicos e sorológicos comprovam a presença de *Salmonella* sp. nos rebanhos suínos. No RS e SC, foram encontradas altas prevalências sorológicas em animais terminados, 81,6% e 92%, respectivamente (SCHWARZ et al., 2006; KICH, 2006). Já Bessa et al. (2004), encontraram uma elevada prevalência (55,6%) de suínos com isolamento de *Salmonella* sp. a partir do conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos, indicando o risco da contaminação das carcaças.

Embutidos tipos frescal, como a lingüiça, podem ser um exemplo do grupo que ofereceria maior risco ao consumidor. Ao lado disso, na fabricação dos embutidos são utilizados porções de carcaças provenientes de diferentes lotes abatidos num mesmo dia, além de haver grande manipulação da matéria-prima até o produto estar finalizado. Esses fatores, sem dúvida, contribuem na amplificação do risco de contaminação do produto final (CASTAGNA, 2004).

Em um estudo prévio desenvolvido no município de Lages, foi encontrada uma prevalência de *Salmonella* sp. de 12,6% em lingüiça frescal suína (MATSUMOTO et al., 2005). Já que estava comprovada a presença do microrganismo em embutidos frescais, surgiu o interesse de se saber qual era o nível de contaminação destes produtos. Com este intuito, foi desenvolvida esta dissertação, na qual foi coletado um maior número de amostras para determinação

de prevalência, sorovares, quantificação e perfil de resistência aos antimicrobianos.

Na primeira etapa do estudo, foi constatado que a frequência dobrou em relação ao trabalho anterior (MATSUMOTO et al., 2005), passando para 27%. Comparando este dado com outros trabalhos desenvolvidos no Brasil, constata-se que esta frequência está bem mais elevada. No Paraná, no Rio de Janeiro e no Rio Grande do Sul, foi encontrado 2, 10 e 11,82%, respectivamente (GALARDA et al., 1999, CHAVES et al., 2000; LOGUERCIO et al., 2002).

Ainda nos dois estudos realizados em Lages/SC, observa-se que as marcas mais encontradas no comércio, e provavelmente as mais consumidas, apresentaram-se com prevalências mais elevadas do que a média (Tabela 1.1). Porém, estatisticamente, não houve diferença significativa entre as frequências das diferentes marcas ( $p=0,1134$ ). Da mesma forma, não houve diferença entre os locais de compra ( $p=0,3421$ ) e entre produtos que eram comercializados em embalagens fechadas e a granel ( $p=0,1413$ ), indicando que provavelmente a maior parte da contaminação presente no produto é oriunda do frigorífico ou da granja e não do estabelecimento comercial.

No estudo, ainda foi encontrada uma grande diversidade de sorovares (15), tanto entre as marcas como dentro delas. Porém, em apenas seis amostras (B3, B6, E1, E3, E6 e G7) foram identificados mais de um sorovar (Tabela 1.2). No presente trabalho, o sorovar mais encontrado foi o Typhimurium (12/60 – 20). No Brasil, os sorovares Typhimurium, Agona, Infantis e Enteritidis foram identificados em casos de infecção alimentar (TAUNAY et al., 1996; ESPER et al., 1998; JAKABI et al., 1997).

Apesar das altas prevalências, apenas uma das amostras (D5;  $>1.100$  NMP/g) apresentou uma quantidade de microrganismo acima da dose infectante

para *Salmonella* sp. (Tabela 1.2). Isto é agravado pelo fato do sorovar isolado nesta amostra ser o Typhimurium, que como já citado anteriormente, está entre os mais isolados em toxinfecção em humanos. Mesmo a grande maioria das amostras apresentando uma contagem baixa o risco de surtos pode estar relacionado a alimentos crus contaminados por embutidos frescos, no momento do preparo, e não propriamente por estes que geralmente são tratados pelo calor antes do consumo (ESCARTÍN et al., 2000; GORMAN et al., 2002).

Independentemente da prevalência encontrada, apenas a marca C encontrou-se dentro do que é determinado pela legislação brasileira, na qual é requerida a ausência de *Salmonella* sp. em 25g de amostra do produto (ANVISA, 2001).

Com a hipótese de que a contaminação do produto seja decorrente da granja ou do frigorífico, as medidas a serem tomadas para minimizar o problema devem levar em consideração que a diminuição da entrada de animais portadores no frigorífico é um ponto crucial, uma vez que práticas adotadas para evitar a contaminação cruzada na linha de processamento não eliminam o risco, se a prevalência de animais positivos ao abate for elevada (SWANENBURG et al., 2001). A retirada da cabeça, bem como a exclusão desta porção da carcaça da fabricação de produtos de consumo, já foram sugeridas (BERENDS, et al. 1996). Esta medida seria interessante, já que existe relação entre a presença de *Salmonella* sp. nos linfonodos submandibulares e tonsilas com o isolamento do microrganismos no produto final (CASTAGNA et al., 2004). Entretanto, vários fatores inviabilizam a adoção dessa medida na rotina de abate. Dessa forma, as porções de músculos presentes nessa região acabam sendo incluídas na fabricação de embutidos e carne mecanicamente separada que chegarão ao consumidor.

Já na segunda etapa do trabalho, foi encontrado 56,67% (34/60) de resistência

a pelo menos um dos antimicrobianos testados e, o que é mais preocupante, 20% das amostras (12/60) apresentaram multi-resistência (resistência a quatro ou mais antimicrobianos). Os maiores índices de resistência foram apresentados contra sulfonamida (45%) e tetraciclina (41,67%) (Tabela 2.1). Isto pode ocorrer porque estes antimicrobianos estão disponíveis a mais tempo no mercado e são comumente utilizados na terapêutica (BAHNSON e FEDORKA-CRAY, 1999; FEDORKA-CRAY e BAHNSON et al., 1999; HARVEY e FARRINGTON et al., 1999). O aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos também tem sido associado a administração excessiva a animais criados para a produção de alimentos (CRUCHAGA et al., 2001; SCHWARZ e CHASLUS-DANCLA, 2001; TEUBER, 2001).

Nenhum dos isolados do sorovar Infantis apresentou resistência a qualquer um dos antimicrobianos. Num levantamento realizado por Taunay et al. (1996), este foi o quarto sorovar mais isolado, no período de 1950 a 1990, de amostras humanas. Porém, as amostras do sorovar Typhimurium foram as que apresentaram maior número de isolados multi-resistentes, sendo que linhagens deste sorovar pertencentes ao fagotipo DT104 são considerados como de maior patogenicidade para humanos (BAGGESEN e AARESTRUP, 1998; NIELSEN et al., 1999).

Uma crescente preocupação tem sido observada em relação ao uso de antimicrobianos na terapêutica e profilaxia em animais de produção, bem como o impacto dessa prática no aparecimento de linhagens resistentes de bactérias presentes em alimentos (THRELFALL, et al., 2000). Existe, ainda, uma grande preocupação em relação ao surgimento de multi-resistência em agentes bacterianos causadores de doenças de origem alimentar que poderiam se constituir em linhagens epidêmicas e de difícil tratamento.

Estas cepas multi-resistentes podem caracterizar um risco a saúde do consumidor. Surtos causados por elas podem representar uma barreira para o sucesso do tratamento, aumentando o custo deste e a mortalidade na população de risco. A antibioticoterapia não é necessária em casos usuais de salmonelose, entretanto nas infecções generalizadas e em pacientes de risco o tratamento precisa ser instituído (PARRY, 2003).

Apesar do perfil de resistência a antimicrobianos não ser considerado a melhor opção para demonstrar o grau de similaridade entre linhagens bacterianas, perfis idênticos dentro de um mesmo sorovar de salmonelas indicam a presença de clones (LIMPITAKIS et al., 1999). Neste estudo, foram encontrados 18 perfis de resistência. Poucos foram os casos de determinados sorovares apresentarem o mesmo perfil e, quando isto ocorreu, as amostras tinham origens distintas. Seria necessária a realização de outras técnicas, como fagotipificação e eletroforese em campo pulsado, para uma melhor discriminação entre os isolados (BESSA, 2006).

A alta prevalência de *Salmonella* sp. em lingüiças frescal suína no presente estudo, aliado ao alto número de isolados resistentes a antimicrobianos, mostra a importância desses resultados em relação à segurança alimentar. Portanto, como já sugerido por Castagna (2004), deveriam ser realizados mais estudos em todas as fases da cadeia suinícola para, a partir daí, implementar um programa de controle de *Salmonella*. Esse programa ainda deveria incluir um monitoramento do uso de antimicrobianos na granja, para controlar o risco de seleção e transmissão de linhagens resistentes até o consumidor. De acordo com Kich (2006) as tecnologias necessárias para o controle incluem métodos de diagnóstico rápido, vacinas, probióticos, produtos de exclusão competitiva, estratégias de limpeza e desinfecção, correção dos fatores de risco, produção em lotes, controle de vetores e ampliação

das medidas de biossegurança.

## 5 CONCLUSÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nos estudos componentes desta dissertação, concluiu-se que:

- 1- As lingüiças tipo frescais de carne suína disponíveis no comércio de Lages, Santa Catarina, apresentam uma prevalência de 27% de isolamento de *Salmonella* sp.;
- 2- Os níveis de contaminação por *Salmonella* sp. foram menores que a dose infectante na grande maioria das amostras analisadas;
- 3- As lingüiças tipo frescal suína disponíveis a população de Lages apresentaram uma grande variedade de sorovares de *Salmonella*, sendo o sorovar Typhimurium o mais freqüente;
- 4- Foi encontrado um alto número de isolados com multi-resistência a antimicrobianos, o que indica a necessidade de uma maior controle dos antimicrobianos utilizados na granja, para minimizar o risco de seleção e transmissão de linhagens resistentes.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. *Resolução –RDC no12, de 02 de janeiro de 2001*. Capturado em 20 nov. 2006. Online. Disponível na Internet <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>.

ATLAS, R. M. *Principles of microbiology*. 2nd ed. USA: Smith, 1997. 1298p.

BAGGESEN, D.L.; WEGENER, H.C. Phage types of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from production animals and humans in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.35, n.4, p.349-354, 1994.

BAGGESEN, D. L.; AARESTRUP, F. Characterization of recently emerged multiple antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and other multiresistant phage types from Danish pig herds. *Veterinary Record*, n. 143, p.95-97, 1998.

BAHNSON, B. P.; FEDORKA-CRAY, P. J. The association of antimicrobial resistance pattern and reported usage of antimicrobials in commercial growing pig production. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3., 1999, Washington. *Proceedings...*Washington, 1999. p. 240-241.

BANDEIRA, R. M.; NADVORNY, A.; COSTA, M. et al. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos ao abate e em cortes de pernil produzidos no Rio Grande do Sul. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS – ABRAVES, 2003. Goiânia, GO. *Anais...* Concórdia: Embrapa, 2003. 483 p. p. 71-72.

BELLO-PÉREZ, L. A. Serotipos de *Salmonella* identificados en chorizos que se expendem en Acapulco, Guerrero, México. *Revista Latino-Americana de Microbiologia*, n. 35, p. 377-381, 1993.

BERENDS, B. R.; URLINGS, A. P.; SNIJDERS, J. M. A. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food Microbiology*, v. 30, p. 37-53, 1996.

BERENDS, B. R.; VAN KNAPEN, F.; MOSSEL, D. A. A. et al. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *International Journal of Food Microbiology*, v.44, n.3, p.219-229, 1998.

BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. R. I. 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.

BESSA, M.C. *Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de Salmonella enterica sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul*. 2006. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BLAHA, T. H. Pre-harvest food safety as integral part of quality assurance systems in the pork chain from "stable to table". In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 4, 2001, Leipzig. *Proceedings...*Leipzig, 2001. p. 7-13.

BLASER, M. J.; NEWMAN, L. S. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Journal of Infections Diseases*, v. 4, p. 1096-1106, 1982.

BOROWSKY, L. M. *Comparação de dois métodos de quantificação de Salmonella sp. em embutidos suínos*. 2005. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bacteriologia)-Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R. et al. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 29. p. 229-234.

CARLSON, S. A.; FERRIS, K. E. Augmentation of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium* DT104 following exposure to penicillin derivatives. *Veterinary Microbiology*, v. 73, p. 25-35, 2000.

CASTAGNA, S. M. F. *Associação da prevalência de suínos portadores de Salmonella sp. ao abate e a contaminação de embutidos tipo frescal*. Porto Alegre – RS. 2004. 110 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias na área de Bacteriologia) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C. W. et al. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32, n. 2, p. 141-147, 2004.

CHAVES, G. M. C.; GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. et al. Avaliação bacteriológica de lingüiça frescal suína comercializada no município do Rio de Janeiro, RJ. *Higiene Alimentar*, v.14, n.74, 2000.

CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; THOEN, C. O. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2 ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. Cap. 13, p. 133-153.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brasil, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 342-346.

CRUCHAGA, S.; ECHEITA, A.; ALADUEÑA, A. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.47, p.315-321, 2001.

DAVIES, P. Food safety and its impact on domestic and export markets. *Swine Health and Production*, v. 5, p. 13-20, 1997.

ESCARTÍN, E. F.; LOZANO, J. S.; RODRIGUEZ, O. et al. Incidence and level of *Salmonella* serovars in raw pork obtained from mexican butcher shops. *Food Microbiology*, v.12, p.435-439, 1995.

ESCARTÍN, E. F.; LOZANO, J. S.; GARCÍA, O. R. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *International Journal of Food Microbiology*, v. 54, p. 19-25, 2000.

ESPER, M. R. N. R.; FREITAS, A. M.; FERNANDES, S. A. et al. *Salmonella*: Sorotipos identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1997. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 57, p. 45-50, 1998.

FEDORKA-CRAY, P. J.; BAHNSON, P. B.; LADELY, S. R. Antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolates collected from slaughter age pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington. *Proceedings...Washington*, 1999. p. 245-247.

FIERER, J.; GUINEY, D. G. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 107, n. 7, april, p. 775-780, 2001.

GALARDA, I.; LIMA, M. L. P. S; MIKOSZEWSKA, I. et al. Pesquisa de *Salmonella* em produtos alimentares de origem animal. *Boletim CEPPA*, v. 9, n. 2, p. 170-177, 1999.

GALTON, M. M.; LOWERY, W. D.; HARDY, A.V. *Salmonella* in fresh and smoked pork sausage. *Journal of Infectious Diseases*. v. 95, p. 232-235, 1954.

GIOVANNINI, A.; PRENCIPE, V.; CONTE, A. et al. Quantative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an italian region. *Food Control*, v.xxx, p.xxx-xxx, 2003.

GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C. C. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, v. 76, p. 143-150, 2002.

HARVEY, R. B.; FARRINGTON, L. A.; BUCKLEY, S. A. et al. Epidemiological survey of antimicrobial-resistant *Salmonella* in market-age swine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington. *Proceedings...Washington*, 1999. p. 252-256.

HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9. ed. New York: Williams & Wilkims, 1994, 787 p.

JAKABI, M.; BUZZO, A. A.; RISTORI, C. A. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.

KICH, J. D. A contaminação por *Salmonella* sp. na produção de suínos da granja ao abate. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, 2006. p. 183-188.

KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N. et al. Resistência antimicrobiana em isolados de *Salmonella* provenientes de granjas de terminação e frigorífico de Santa Catarina. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, 2006. p. 461-463.

KURI, V.; MADDEN, R. H.; COLLINS, M. A. Hygienic quality of raw pork and chorizo (raw pork sausage) on retail sale in Mexico city. *Journal of Food Protection*, v.59, n.2, p.141-145, 1995.

LIMPITAKIS, N.; et al. Antibiotic sensitivity profile of *Salmonella* isolated from two slaughterhouses and human clinical cases. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington, 1999. p. 257-260.

LOBO, M. V.; UGALDE, M. G.; FRIES, L. L. M. et al. Avaliação de salames coloniais comercializados no município de Santa Maria-RS. *Higiene Alimentar*, v.15, n.xx, 2001.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G.; VARGAS, A. C. et al. ELISA indireto na detecção de *Salmonella* spp. em lingüiça suína. *Ciência Rural*, v. 32, n. 6, p. 1057-1062, 2002.

MATSUMOTO, S. R.; SPRICIGO, D. A.; ESPÍNDOLA, M. L. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp. em lingüiça tipo frescal de matéria-prima suína disponível à população de Lages/SC. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA, 12, 2006, Lages. *Anais...* Lages, 2006. p. 124.

MCEWEN, S. A. Food safety in relation to antibiotic resistance. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS VETERINARY, 19, 2006, Copenhagen. *Proceedings...* Copenhagen, 2006. p. 10-13.

MICHAEL, G.; SIMONETTI, R.; COSTA, M. et al. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 138-142, 2003.

MONNET, D. L.; EMBORG, H. D.; ANDERSEN, S. R. et al. Surveillance of antimicrobial resistance in Denmark. *European Communicable Disease Bulletin*, v.5, n.12, p. 129-132, 2000.

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, p. 47- 51, 2004.

NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 11th informational supplement. Approved standard M2-A7 and M7-A5. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, PA, USA, 2001.

NIELSEN, B.; MOGELMOSE, V.; SORENSEN, L. L. et al. Tracing back multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 from pork at the slaughterhouse to a specific swine herd by strategical use of serology and culture. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 3, 1999, Washington. *Proceedings...Washington*, 1999. p.261-263.

OLSEN, J. E; SORENSEN, M.; BROWN, D. J. et al. Plasmid profiles as an epidemiological marker in *Salmonella enterica* serovar *berta* infections. Comparison of isolates obtained from humans and poultry. *APMIS*, v. 100, n. 3, p. 221-228, 1992.

OYEKOLE, O. D.; HASSAN, J. O. A survey of the bacteriological status of fresh and baked pork sausages produced in Ibadan, Nigeria. *International Journal Zoonoses*, v. 11, n. 2, p. 127-132, 1984.

PARRY, C. M. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.16, p.467-472, 2003.

REIS, R. B.; KRUGER, C. S.; MACIEL, M. S. *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá- MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v. 15, n. 1, p. 74-78, 1995.

RICHARDSON, J. H.; GALTON, M. M.; STARR, L. E. Potential bacterial pathogens in retail market foods. *American Veterinary Meeting*. Colorado, 1960.

ROBERTS, D.; BOAG, K.; HALL, M. L. M. et al. The isolation of *Salmonellas* from British pork sausage meat. *Journal of Hygiene*, v. 75, p. 173-184, 1975.

ROSTAGNO, M. H. *Epidemiologia e Diagnóstico das Infecções por Salmonella sp. em suínos*. 2002. 56 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p. Cap. 12: Estudo de dispersão de frequência, p. 107-121.

SAS INSTITUTE (CARY NC). *SAS User Guide: Statical Analysis System*, release 8.2, 1999.

SCHLOSSER, W.; HOGUE, A.; EBEL, E. et al. Analysis of *Salmonella* serotypes from selected carcasses and raw ground products sampled prior to implementation of the pathogen reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point final rule in the US. *International Journal of Food Microbiology*, v. 58, p. 107-111, 2000.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, v.32, p.201-225, 2001.

SCHWARZ, P. *Prevalência sorológica e de isolamento de Salmonella enterica em suínos abatidos no sul do Brasil*. 2006. 65 f. Dissertação ( Mestrado)- Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, B. E. et al. *Diseases of swine*. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 2000. cap.39, p. 535-551.

SINELL, H. J.; PIETZCH, O.; KLINGBELL, H. et al. Estimation of most probable number in retail samples of minced pork. *International Journal of Food Microbiology*, v.11, p.135-142, 1990.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. et al. *Clínica e patologia suína*. 2 ed. Goiânia: J. Sobestiansky, 1999. 464 p.

SOJKA, W. J.; GITTER, M. Salmonellosis in pigs with reference to its public health significance. *Veterinary Reviews and Annotations*, v. 7, p. 11-28, 1961.

STRAPAZZON, R. *Apostila técnica Duas Rodas para frigoríficos*. Jaraguá do Sul, SC Frigo Representações, 1997. 79p.

SWANENBURG, M.; BERENDS, B. R.; URLINGS, H. A. P. et al. Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork. *Berliner und*

*Münchener tierärztliche Wochenschrift*, v. 114, p. 356-359, 2001.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H. A. P.; KEUZENKAMP, D. A. et al. Tonsils of slaughtered pigs as marker sample for *Salmonella* positive pork. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, p.264-265, 1999.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, A. S.; TAVECHIO, A. T. et al. The role of public health laboratory in the problem of Salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, p. 119-127, 1996.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, v.4, p.493-499, 2001.

THRELFALL, E. J.; FROST, J. A.; WARD, L. R. et al. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella* Typhimurium DT104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Veterinary Record*, n.134, p.577, 1994.

THRELFALL, E. J.; WARD, L. R.; FROST, J. A. et al. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.62, p.1-5, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Introducion a la microbiologia*. 3.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 792 p.

WILCOCK, B. P.; SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: LEMAN, A. D. *Diseases of swine*. 7 ed. Lodon: Wolfe, 1993. Cap. 46, p. 570-583.

ZEBRAL, A. A.; FREITAS, C. A.; HOFER, E. Ocorrência de *Salmonella* em gânglios linfáticos de suínos aparentemente normais, abatidos no matadouro de Santa Cruz, cidade do Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.72, n.3/4, p. 223-235, 1974.