

Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e lingüiças comercializados na cidade de Botucatu

Vera Lúcia Mores RALL¹
José Guilherme Prado
MARTIN¹
João Manuel Grisi CANDEIAS¹
Karen Franco Godoy
CARDOSO¹
Márcia Guimarães da SILVA²
Ricardo RALL³
João Pessoa ARAÚJO
JÚNIOR¹

Correspondência para:
CP 510, CEP 18618-000. Botucatu/SP;
vlmores@ibb.unesp.br

Recebido para publicação: 07/11/2007
Aprovado para publicação: 27/11/2008

1 - Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP
2 - Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP
3 - Faculdade de Tecnologia, Botucatu-SP

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar as condições sanitárias de frango e diversos tipos de lingüiças comercializados na cidade de Botucatu, São Paulo, pela determinação do número mais provável de coliformes a 45°C/g além da pesquisa de *Salmonella* pela metodologia tradicional e pela PCR. Foram coletadas 50 amostras de carcaça de frango e 75 de lingüiças frescas, procedentes de nove estabelecimentos diferentes da cidade, no período de abril a novembro de 2006. Das 50 amostras de frango, 35 (70%) estavam fora dos parâmetros microbiológicos, segundo a RDC n°12 da Anvisa (>10⁴ coliformes a 45°C/g). Embora nessa Resolução, a pesquisa de *Salmonella* não seja exigida, 4 amostras (8%) apresentaram o patógeno pela metodologia tradicional. Essa presença foi confirmada pela PCR, que também foi positiva para mais 23 amostras, num total de 27 positivas (54%). Dentre as 75 amostras de lingüiças, 30 (40%) estavam fora dos limites permitidos, com 7 amostras positivas para *Salmonella*, pela metodologia tradicional. Entretanto, se considerar-se a pesquisa pela PCR, o número de amostras positivas aumenta para 42 (56%). Somando-se a taxa de freqüência de *Salmonella* aos limites microbiológicos para coliformes a 45°C, 86,7% das lingüiças analisadas estavam impróprias para o consumo.

Palavras-chave:
Frango.
Lingüiça.
Coliformes.
Salmonella.
PCR.

Introdução

O hábito de consumo de carne de frango por parte dos brasileiros vem mudando devido à queda gradual de preço, à boa qualidade e à praticidade dos produtos oferecidos. Nesse período, o consumo *per capita* aumentou de 10 kg para 35,4 kg, ficando pouco abaixo do consumo de carne bovina (36,3 kg).¹ Quanto à produção, o Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango, com 41% de participação no comércio internacional. A carne de porco é a terceira mais consumida no Brasil e, apesar de representar apenas um terço do consumo de carne de frango/bovina, os 11,3 kg

consumidos *per capita* ainda é valor considerável. Destes, cerca de 70% são comercializados na forma de embutidos, principalmente como lingüiças.²

Tendo em vista o grande consumo de carnes e a tendência mundial desse aumento, a qualidade desses produtos é extremamente importante, sendo uma preocupação dos órgãos de saúde pública, das indústrias alimentícias e dos próprios consumidores. As aves criadas para consumo humano podem ser hospedeiras naturais de vários microrganismos patogênicos, como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* sp e *E. coli*.^{3,4}

A *Salmonella* apresenta amplo espectro de hospedeiros, principalmente aves.⁵ O gênero compreende bacilos Gram-negativos

não produtores de esporos, anaeróbios facultativos e a maioria é móvel (exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*). Essa bactéria representa um dos maiores perigos à indústria alimentícia, pois é um agente etiológico causador de gastroenterites.⁶ O período de incubação da salmonelose é, em média, de 48 horas e os alimentos mais frequentemente implicados são os de origem animal, particularmente carnes de frango, ovos e alimentos mal cozidos.

No Brasil, a subnotificação de casos de infecções por *Salmonella* representa um grave problema, pois os números divulgados pelos órgãos de vigilância sanitária parecem não corresponder à realidade. Mesmo assim, estimativas sobre a frequência de infecções por *Salmonella* permitem sugerir um coeficiente de casos de 145/100.000 habitantes⁷, número muito superior ao encontrado em países como Portugal, Inglaterra e Alemanha (4,5; 28 e 93,3/100.000 habitantes, respectivamente)⁸.

Análises microbiológicas aplicadas à cadeia de produção de alimentos têm por objetivo minimizar os riscos de infecção nos consumidores e atestar a qualidade dos produtos comercializados. Metodologias tradicionais para detecção de patógenos consistem de enriquecimento e isolamento de colônias de microrganismos em meios de cultura apropriados⁹, necessitando-se vários dias para que se obtenham resultados confiáveis. Métodos convencionais de isolamento usados para *Salmonella* incluem pré-enriquecimento em meio não-seletivo, seguido de enriquecimento seletivo e semeadura em, pelo menos dois ágar seletivos. Colônias suspeitas são confirmadas bioquímica e sorologicamente, somando-se até sete dias para a obtenção de resultados positivos.¹⁰ Além disso, a sensibilidade desta metodologia pode ser menor do que as baseadas na detecção de DNA, devido à inabilidade do crescimento de células injuriadas ou que estiverem no estado “viável não cultivável”.¹¹ Por outro lado, métodos moleculares baseados em amplificação de DNA, pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma alternativa viável para a

detecção de microrganismos em amostras de alimentos, sendo a rapidez, especificidade e sensibilidade suas maiores vantagens. Entretanto, a susceptibilidade às substâncias inibitórias presentes em amostras com matrizes complexas, como alimentos, pode ser uma desvantagem¹¹. Para se evitar resultados falso-positivos e diluir possíveis substâncias inibidoras, recomenda-se o emprego de, pelo menos, um pré-enriquecimento não seletivo¹¹. Também deve ser considerada, a detecção de moléculas de DNA liberadas pela morte bacteriana, no caso de alimentos submetidos a processamentos térmicos. *Salmonella* têm-se mostrado bastante sensível a essa ferramenta, necessitando, porém, de procedimentos de enriquecimento para se aumentar essa sensibilidade.¹² O método é evidentemente vantajoso se comparado ao convencional, demorado e trabalhoso, visto que a rapidez no diagnóstico da qualidade dos produtos a serem comercializados é de grande interesse das redes de produção de alimentos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as condições higiênico-sanitárias de carne de frango e diversos tipos de linguiças comercializados na cidade de Botucatu, estado de São Paulo, pela determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45°C, além da pesquisa de *Salmonella* pela metodologia tradicional e pela PCR.

Material e Método

Foram coletadas 50 amostras de carne de frango e 75 de linguiças frescas, procedentes de nove estabelecimentos diferentes da cidade de Botucatu, São Paulo, no período de abril a agosto de 2006 e as carcaças foram mantidas nas embalagens de comercialização e transportadas imediatamente até o laboratório, sob refrigeração, em caixas isotérmicas.

Para a análise, 25 gramas da amostra foram homogeneizados em 225 ml de água tamponada peptonada 1% (Stomacher Lab Blender 400). A partir desta diluição inicial de 10⁻¹, foram preparadas várias diluições

decimais, utilizando-se o mesmo diluente.

Para enumeração de coliformes a 45°C, foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, semeando-se em triplicata, volumes de 1 mL de diluições sequenciais em caldo lauril sulfato (Difco, EUA, Sparks) com um tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35°C/48 h. Nos inóculos positivos foi observada a produção de gás no tubo de Durham e os tubos positivos foram repicados para caldo E.C. (Difco), para a confirmação de coliformes a a 45°C, incubados nessa temperatura/24 h, em banho-maria. A leitura ocorreu pela observação da presença de gás no tubo de Durham invertido. Utilizou-se uma tabela para o cálculo do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45°C por grama de amostra analisada¹³.

Para a detecção da presença de *Salmonella*, 25 gramas de amostra foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada 1 %, no “Stomacher”, com incubação a 35°C/24 h. Em seguida, foi transferido 1 mL do homogeneizado para um tubo com 10 mL de caldo tetrionato (Difco), suplementado imediatamente antes do uso com 0,2 ml de solução de iodo e incubado a 35°C/24 h. Outra alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo com 10 mL de caldo Rapaport (Difco), incubado a 42°C/24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em placas de Petri contendo ágar XLD (xilose-lisina-desoxicolato- Difco) e ágar SS (*Salmonella-Shigella*- Difco), incubadas a 35°C/24 h. As colônias características de *Salmonella* repicadas para tubos de ágar tripticase soja inclinado (TSA- Difco), incubados a 35°C/24 h. A partir dessas cepas estoque foram realizados os testes bioquímicos com agar TSI (Agar Tríplice Açúcar Ferro- Difco) e agar Fenilalanina (Difco) Após a leitura desses testes preliminares, as cepas suspeitas foram submetidas a API 20 E (Biomérieux, França, Paris) e, a seguir, foi realizada a sorologia com soros anti antígeno somático e flagelar (Probac, Brasil, São Paulo).¹⁴

Paralelamente, a partir dos caldos de

enriquecimento ocorreu a pesquisa da presença de *Salmonella* pela PCR. Assim, 1 ml dos caldos Tetrionato e Rapaport-Vassiliadis, foi centrifugado a 10.000g/10 minutos. O sobrenadante era desprezado e o sedimento, ressuspenso em 1 ml de PBS (Solução Tampão de Fosfato 0,01 M, pH 7,2). Esse passo foi repetido mais duas vezes, com tempo de centrifugação de 5 minutos. A seguir, o sedimento foi ressuspenso em 200 µl de tampão de lise (50 mM Tris-H-Cl, 1 mM EDTA 0,025% Tween, 0,2 mg proteinase K) incubado em banho-maria a 56°C/1 hora e depois, a 95°C/10 minutos. Ocorreu nova centrifugação a 13.000g/5 minutos e o sobrenadante foi usado para a reação da PCR.¹¹

Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrifuga (Axygen, Estados Unidos, Union City) num volume total de 25 µL, composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x (Invitrogen, Estados Unidos, Carlsbad), 0,75 µM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP (Invitrogen), 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 10 picomoles de cada *primer*, água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com 94°C/30s, 60°C/30s e 72°C/30s. A temperatura de extensão final foi de 72°C por 4 minutos. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição da amostra por água ultrapura. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa padrão de *Salmonella Choleraesuis* ATCC 13076 e como negativo, a amostra foi substituída por água ultrapura esterilizada. O par de primers utilizado codifica para o gene *invA*, com a seguinte sequência: *invA1*: TCATCGCACCGTCAAAGGAAC e *invA2*: GTGAAATTATCGCCACGTTTCGG, gerando um produto de 284 pb.¹¹

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese

(Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com brometo de etídio (0,5 mg/ml - Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 50 bp (GE Healthcare), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

As proporções de positividade de *Salmonella* no frango foram analisadas pelo teste de Comparação de Proporção entre dois grupos (Teste Z, 5%).¹⁵

Resultados

Foram analisadas 50 amostras de carne de frango, onde 35 (70%) estavam fora dos parâmetros microbiológicos, segundo a RDC n°12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹⁶ (até 10⁴ coliformes a 45°C/g). Embora a pesquisa da presença de *Salmonella* não seja exigida, 4 (8%) amostras apresentaram o patógeno pela metodologia tradicional. Essa presença foi confirmada pela PCR, que também foi positiva para mais 23 amostras, num total de 27 positivas (54%) nessa metodologia ($z = 4,757$; $p < 0,001$). Os primers utilizados

nesse trabalho, na análise pela PCR, geraram os produtos observados na figura 1.

Os padrões microbiológicos para lingüiças frescas¹⁶ permitem até 5x10³ de coliformes a 45°C/g e não toleram a presença de *Salmonella* em 25 g do alimento. Entre as 75 amostras de lingüiças, 30 (40%) estavam fora dos limites permitidos, devido excesso de coliformes, com 7 amostras também positivas para *Salmonella* (9,3%), pela metodologia tradicional. Entretanto, se for considerada a pesquisa pela PCR, o número de amostras positivas aumenta para 42 (56%) ($z = 5,924$; $p < 0,001$). Somando-se a taxa de frequência de *Salmonella* aos limites microbiológicos para coliformes a 45°C, 86,7% das lingüiças analisadas estavam impróprias para o consumo.

Discussão

Apesar dos coliformes a 45°C serem o único padrão microbiológico da carne de frangos, poucos trabalhos no Brasil relatam esse tipo de contaminação. Em 2002, Silva et al.¹⁷ pesquisaram 60 cortes de frangos adquiridos no comércio de João Pessoa (PB) e 100% apresentaram coliformes a 45°C. Recentemente, em 2005, Cardoso et al.¹⁸ observaram somente 26% de amostras impróprias para consumo entre as 35 analisadas, número inferior ao encontrado

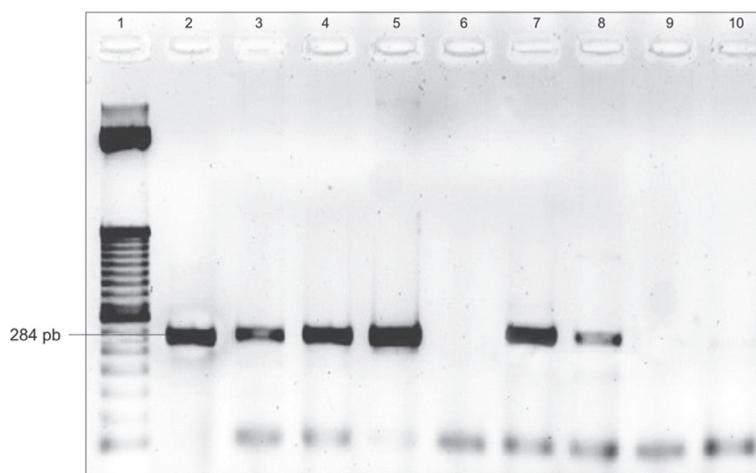


Figura 1 - Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *invA*. Poço 1: marcador de pares de base (50bp); poço 2: *Salmonella* Choleraesuis ATCC 13706; poços 3, 4, 5, 7 e 8: amostras positivas; poços 6 e 9: amostras negativas; poço 10: controle negativo

no presente estudo, de 70%.

A ocorrência de *Salmonella* em carne de frango (carcaças e cortes) pode variar consideravelmente. Esta variação pode estar relacionada com a procedência do lote (contaminação primária), condições higiênico-sanitárias do abatedouro, contaminação cruzada durante as etapas do abate, além do transporte e comercialização.¹⁹

Pela metodologia tradicional, esse trabalho observou frequência de 8%, quanto à presença de *Salmonella*. Cardoso et al.¹⁸ e Baú, Carvalho e Aleixo²⁰ apresentaram resultados semelhantes aos encontrados nessa pesquisa, com a presença de *Salmonella* em, respectivamente, 10,5% e 11,4% das amostras analisadas. Carvalho e Cortez²¹ relataram taxas maiores, de 20% de positividade.

A maioria dos trabalhos publicados que apresenta níveis de frequência de *Salmonella* não ultrapassa 30% em amostras de carne de frango, utilizando-se a metodologia tradicional. No Brasil, Gonçalves, Franco e Zamborlini²² observaram que 26,7% das amostras procedentes do estado do Rio de Janeiro estavam contaminadas com o patógeno. Valor semelhante foi observado na Inglaterra por Jorgensen et al.²³, que encontraram 25% de amostras positivas. Em Maryland, Estados Unidos, Myint et al.²⁴ observaram taxas que variaram de 22 a 28%. Segundo Mattick et al.²⁵ um dos principais problemas no isolamento de *Salmonella* é o pequeno número dessa bactéria, em relação à quantidade de outras bactérias competidoras.

A frequência foi bem maior quando foi utilizada a PCR como ferramenta. Almeida Filho et al.²⁶ encontraram uma taxa de 45% (18/40) de amostras de frango contaminadas por *Salmonella* em Cuiabá, número próximo ao encontrado pela presente pesquisa (54%).

Na enumeração de coliformes a 45°C em lingüiças frescas, o presente estudo encontrou 30 amostras impróprias para o consumo (40%), número muito superior ao relatado por Salvatori, Bessa e Cardoso²⁷,

de 7%, em Porto Alegre (RS). Entretanto, Marques et al.²⁸, pesquisaram 40 amostras desse alimento em Lavras e Três Corações (MG) e 35% estavam com concentrações de coliformes a 45°C acima dos limites permitidos pela ANVISA¹⁶.

Em relação à pesquisa de *Salmonella* pela metodologia tradicional, os números relatados na bibliografia variam bastante. Giovannini et al.²⁹ observaram taxa de 17,6% de amostras positivas em lingüiças comercializadas na região de Abruzzi, Itália, enquanto que Mrema, Mpuchane e Gashe³⁰ encontraram o patógeno em 26% das amostras procedentes do comércio de Gaborone, Botswana, números acima dos encontrados pela presente pesquisa (7,5%).

Porém, a positividade de *Salmonella* foi bem maior quando a metodologia adotada foi a PCR. Castagna et al.³¹ relatam a presença do patógeno em 66% das amostras (25/38) de lingüiças frescas provenientes da região sul do Brasil, número pouco acima do encontrado pelo presente estudo, de 56%.

Em relação às metodologias empregadas, pode-se concluir que a PCR mostrou-se mais sensível que a tradicional. É importante acrescentar que a metodologia de PCR mostra-se realmente eficaz quando as amostras são submetidas anteriormente a um período de enriquecimento. Myint et al.²⁴ obtiveram resultados satisfatórios com um período mínimo de enriquecimento de 8 horas, diferentemente de outros autores que advertem que são necessárias 10 horas, no mínimo, para a plena eficácia da metodologia.³² O presente trabalho utilizou 24 horas de enriquecimento, tempo igual a metodologia tradicional.

Como já foi observado por outros autores^{26,31}, a frequência de detecção de *Salmonella* aumentou quando se utilizou a PCR. A possibilidade de ter ocorrido detecção de DNA liberado de células mortas é pequena. Primeiramente, porque as amostras não foram previamente submetidas a nenhum tratamento que reduzisse a contaminação com morte da microbiota (temperatura ou irradiação), além disso, essa técnica foi positiva em todas as amostras

onde a *Salmonella* também havia sido isolada pela metodologia tradicional. Também deve ser considerado que a PCR, uma vez padronizada adequadamente, apresenta grande reprodutibilidade, se realizada com critério. Na metodologia tradicional, a observação e senso crítico, no momento da leitura das placas de isolamento tem ser constantes, podendo ocorrer erros de

interpretação mais frequentemente.

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que esses alimentos representam perigo à saúde dos consumidores, sendo necessárias medidas para um maior controle e fiscalização por parte das autoridades de vigilância sanitária, a fim de que se reduzam os índices de frequência de *Salmonella* em carne de frango e lingüiças frescas.

Research of *Salmonella* and sanitary conditions in poultry and sausages retailed in Botucatu

Abstract

In the present investigation were evaluated the sanitary conditions of poultry and several types of sausages retailed in Botucatu, São Paulo, Brazil for the determination of the most probable number of coliforms at 45°C/g besides the research of *Salmonella* using traditional methodology and PCR. In order to do so, 50 samples of poultry and 75 of sausages were collected from nine different establishments in the city, in the period of April to November of 2006. Of the 50 samples of chicken meat, 35 (70%) were out of the microbiologic parameters, according to Brazilian Sanitary Resolution RDC n°12 of Anvisa (>10⁴ coliforms at 45°C/g). In this Resolution, the research of *Salmonella* is not demanded, but 4 samples (8%) presented the pathogen using the traditional methodology. That presence was confirmed by PCR, which was also positive in another 23, in a total of 27 positive samples (54%). Among 75 samples of sausages, 30 (40%) were out of the allowed limits, with 7 positive samples for *Salmonella*, using traditional methodology. However, if we consider PCR test, the number of positive samples increases to 42 (56%). Adding this number to coliforms microbiological limits, 86.7% of the analyzed sausages were inappropriate for the consumption.

Key words:

Poultry.
Sausage.
Coliforms.
Salmonella.
PCR.

Referências

- 1 UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório anual 2005-2006**. Disponível em <http://www.uba.org.br/uba/news_files/rel_uba_2005_06.pdf>. Acesso em: 30 out. 2008.
- 2 ZOOTEC, 2004, Brasília. **Carne de porco agora é símbolo de qualidade**. Disponível em : <<http://www.upis.br/zootec2004/noticias3.asp>>. Acesso em: 30 out. 2008.
- 3 LUCEY, B.; FEURER, C.; GREER, P.; MOLONEY, P.; CRYAN, B.; FANNING, S. Antimicrobial resistance profiling and DNA Amplification Fingerprint (DAF) of thermophilic *Campylobacter* spp. in human, poultry and porcine samples from the Cork region of Ireland. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 727-734, 2000.
- 4 NATRAJAN, N.; SHELDON, B. W. Inhibition of *Salmonella* on poultry skin using protein and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 9, p. 1268-1272, 2000.
- 5 WAAGE, A. S.; VARDUND, T.; LUND, V.; KAPPERUD, G. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 418-428, 1999.
- 6 SIQUEIRA, R. S.; DODD, C. E. R.; REES, C. E. D. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 118-120, 2003. Supplement.
- 7 EDUARDO, M. B. P.; KATSUYA, E. M.; BASSIT, N. P.; MELLO, M. L. R. *Salmonella enteritis*: uma importante causa de surtos bacterianos veiculados por alimentos e a necessidade de uma nova regulamentação

- sanitária para alimentos implicados, São Paulo, Brasil, 1999-2003. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 1, n. 8, 2004. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa8_salmo9903.htm>. Acesso em: 20 de set. 2006.
- 8 WHO 1999-2000. Disponível em: <http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm>. Acesso em: 10 nov. 2006.
- 9 CORRY, J. E.; POST, P. C.; LAISNEY, M. J. Culture media for the isolation of campylobacters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 43-76, 1995.
- 10 BENNET, A. R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J. G.; BETTS, R. P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters of Applied Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 437-441, 1998.
- 11 ARNOLD, T.; SCHOLZ, H. C.; MARG, H.; ROSLER, U.; HENSEL, A. Impact of invA-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of salmonella in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. **Journal of Veterinary Medicine series B**, v. 51, n. 10, p. 459-463, 2004.
- 12 NIEROP, W.; DUSÉ, A. G.; MARAIS, E.; AITHMA, N.; THOTHOBLO, N.; KASSEL, M.; STEWART, R.; POTGIETER, A.; FERNANDES, B.; GALPIN, S. J.; BLOOMFIELD, S. F. Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 1-6, 2005.
- 13 KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. p. 69-82.
- 14 ANDREWS, W. H.; FLOWERS, J. S.; BAILEY, J. S. *Salmonella*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. p. 357-380.
- 15 ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 718 p.
- 16 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Regulamento técnico de padrões microbiológicos para alimentos, Resolução RDC Nº 12, 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em 25 out. 2008.
- 17 SILVA, J.A.; AZERÉDO, G.A.; BARROS, C. M. R.; COSTA, E. L.; FALCÃO, M. M. S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango. **Higiene Alimentar**; v.16, n. 100, p. 97-101, 2002.
- 18 CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N. C.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E. S. Pesquisa de *Salmonella* spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v. 19, n.128:p. 144- 150, 2005.
- 19 OLSEN, J. E.; BROWN, D. J.; MADSEN, M.; BISGAARD, M. Crosscontamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 826-835, 2003.
- 20 BAÚ, A. C.; CARVALHO, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p.303-307, 2001.
- 21 CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, 2005.
- 22 GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M.; ZAMBORLINI, L. C. Enumeração de enterococos e coliformes fecais, pesquisa de *Salmonella* e indicação presumtiva de *Proteus*, em cortes e miúdos de frango congelados. **Higiene Alimentar**, v.12, n. 54, p. 42-47, 1998.
- 23 JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLINS, S.; HENDERSON, P.; WARCING, D. R.; BOLTON, E. J.; FROST, J. A.; WARD, L.; HUMPHREY, T. J. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on cow, whole chicken in relation to sampling methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, n. 1/2, p. 151-164, 2002.
- 24 MYINT, M. S.; JOHNSON, Y. J.; TABLANTE, N. L.; HECKERT, R. A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 599-604, 2006.
- 25 MATTICK, K. L.; BAILEY, R. A.; JORGENSEN, F.; HUMPHREY, T. J. The prevalence and number of *Salmonella* in sausages and their destruction by frying, grilling or barbecuing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 541-547, 2002.
- 26 ALMEIDA FILHO, E. S.; SAMPAIO, S. C. O.; BORGES, N. F.; DELMONDES, E. C.; OZAKI, A. S.; SOUZA, L. C. Pesquisa de *Salmonella* spp em carcaças de frango (*Gallus gallus*), comercializadas em feira livre ou em supermercado no município de Cuiabá, MT, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 110, p. 74-79, 2003.
- 27 SALVATORI, R. U.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. R. I. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto Alegre-RS. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 771-773, 2003.
- 28 MARQUES, S. C.; BOARI, C. A.; BRCKO, C. C.; NASCIMENTO, A. R.; PICCOLI, R. H. Avaliação higiênico-sanitária de lingüiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras, MG. **Ciências Agrotécnicas**, v. 30, n. 6, p. 1120-1123, 2006.
- 29 GIOVANNINI, A.; PRENCIPE, V.; CONTE, A.; MARINO, L.; PETRINI, A.; POMILIO, F.; RIZZI, V.; MIGLIORATI, G. Quantitative risk assessment of

Salmonella spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. **Food Control**, v. 15, n. 2, p. 139-144, 2004.

30 MREMA, N.; MPUCHANE, S.; GASHE, B. A. Prevalence of *Salmonella* in raw minced meat, raw fresh sausages and raw burger patties from retail outlets in Gaborone, Botswana. **Food Control**, v. 17, n. 3, p. 207-212, 2006.

31 CASTAGNA, S. M. F.; MULLER, M.; MACAGNAN, M.; RODENBUSCHE, C. R.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. Detection of *Salmonella* sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 373-377, 2005.

32 SOUMET, C.; GWENNOLA, E.; FACH, P.; COLIN, P. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 294-298, 1994.