

CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS (HIGIÉNICO-SANITÁRIAS) DAS LINGÜIÇAS FRESCAS COMERCIALIZADAS EM FEIRAS LIVRES NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO - SP. II. AGENTES ETIOLÓGICOS DE TOXINFECÇÕES ALIMENTARES*

JURANDIR CHAVES DE VASCONCELOS**
SEBASTIÃO TIMO IARIA***

Foram estudadas sessenta amostras de linguiça fresca provenientes de igual número de feiras livres do Município de São Paulo, com a finalidade de verificar se as mesmas estavam sendo veículos de agentes de toxinfecções alimentares. Para isto, foi realizado estudo qualitativo e quantitativo com alguns dos principais microrganismos responsabilizados: *Staphylococcus aureus* com a verificação de produção de enterotoxinas, pelas cepas isoladas, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* tipo A e *Salmonella*. Em 55 (91,7%) das amostras, foi detectada uma ou mais dessas bactérias, estando *S. aureus* em 52 (86,7%), o *B. cereus* em 6 (10%), o *C. perfringens* tipo A em 7 (11,7%) e a *Salmonella* em 8 (13,3%). A determinação quantitativa do *S. aureus* apresentou variação de <50 a 40000. *B. cereus* de <100 a 2500, o *C. perfringens* A de <10 a 4000, todos esses resultados por grama de alimento analisado. De 52 cepas de *S. aureus* selecionadas, foi verificado a sua capacidade de produzir enterotoxinas, tendo 4 destas (7,6%) se revelado enterotoxigênicas; 2 produtoras de enterotoxina do tipo B, 1 do C e 1 dos tipos A e B concomitantemente.

1 INTRODUÇÃO

Muitos estudos têm mostrado e enfatizado o papel dos alimentos produzidos, processados e conservados em condições inadequadas, na transmissão de agentes patogênicos ao homem, podendo seu consumo acarretar risco à sua saúde.

Com relação aos alimentos de origem animal, praticamente, todos podem transmitir agentes patogênicos ao homem destacando-se, a

*Parte do trabalho experimental da Tese de Doutoramento do primeiro autor.

**Pesquisador do INPA/MCT - Manaus - Am.

***Professor Titular do ICB/USP.

carne e seus derivados incluindo os embutidos e, particularmente as linguiças.

A grande maioria dos microrganismos causadores de enfermidade transmitida pelos alimentos, tem como fonte comum as matérias fécais, humanas ou animais. A pesquisa rotineira destes patógenos e de seus produtos tóxicos, em alimentos, não é possível na maioria das vezes, pelos laboratórios de controle. As técnicas utilizadas para sua detecção além de serem complexas, demoradas e, para alguns microrganismos, muito pouco sensíveis, são também de alto custo. Entretanto, em algumas ocasiões, como da ocorrência de um determinado surto ou mesmo caso isolado de toxinfecção alimentar, quando é possível detectar no alimento implicado o microrganismo patogênico ou a toxina responsável, a sua pesquisa direta se constitui no procedimento mais recomendável, ao invés da pesquisa de indicadores (28).

Apesar das dificuldades acima referidas de execução e custo e, principalmente, pelo interesse epidemiológico, incluiu-se no presente trabalho além dos indicadores clássicos, microrganismos mesófilos, coliformes totais e fecais (34) a pesquisa direta de alguns dos principais agentes bacterianos conhecidos que podem ser responsáveis por casos ou surtos de toxinfecções alimentares, que são: *S. aureus* enterotoxigênico, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* tipo A e bactérias do gênero *Salmonella*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas sessenta amostras de linguiça fresca, sem especificação de marcas, coletadas de igual número de feiras livres, do Município de São Paulo, conforme já descrito em trabalho anterior (34), e processadas para a pesquisa de alguns agentes etiológicos de toxinfecções alimentares.

Staphylococcus aureus:

A partir de cada uma das diferentes diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) do alimento em estudo, era tomada uma aliquote de 0,2 ml e depositada na superfície de ágar Baird-Parker em placas. Utilizando-se um bastão de vidro em "L" estéril, o inoculo era espalhado, em toda a superfície do ágar, iniciando-se esta operação pela placa correspondente a maior diluição do alimento. Posteriormente, estas placas eram incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas (13). A contagem, isolamento e identificação das colônias suspeitas foram efetuadas segundo as recomendações do ICMSF (13) realizando-se as seguintes provas de identificação: catalase (13), prova de oxidação/fementação (O/F) da glicose (segundo o Sub-Comitê Internacional de Taxionomia de *Staphylococcus* e *Micrococcus* 1965), prova de coagulase livre (13), prova de teironuclease / TNase (13, 18) e a pesquisa da capacidade de produção de enterotoxinas pelas cepas de *S. aureus* isoladas, efetuada pelo método da "sensibilidade ótima em placa" (13, 30).

Bacillus cereus:

Aliquotas de 0,1 ml das diferentes diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) do alimento em estudo, eram depositadas na superfície de ágar gema de ovo polimixina vermelho de fenol em placas, procedendo-se a seguir o seu espalhamento com o auxílio de um bastão de vidro em "L", estéril e iniciando-se pela maior diluição. Es-

tas placas eram em seguida, incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas (13). A contagem e isolamento de colônias suspeitas foi realizada segundo o ICMSF (13) e GEOPFERT (8), e a identificação das cepas isoladas através das seguintes provas recomendadas por GORDON et al (9): produção de catalase, motilidade, Voges-Proskauer, crescimento em meio com pH 5,7, em meio com 7% de cloreto de sódio, em anaerobiose, produção de ácido em meios contendo carboidratos, utilização do citrato, redução de nitrato, desaminação da fenilalanina, decomposição da caseína e tirosina e hidrólise do amido. Além destas provas, na diferenciação entre *B. cereus* e *B. anthracis*, foi incluído o teste do crescimento em ágar contendo hidrato de cloral (16).

Clostridium perfringens tipo A:

Aliquotas de 1,0 ml da amostra em estudo, nas diluições decimais de 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ eram, individualmente depositadas em placas de Petri estéreis, sendo a seguir adicionadas cada uma delas 15 ml de ágar sulfato de polimixinha sulfadiazina (SPS), previamente fundido e resfriado a 45°C. Logo em seguida, efetuou-se a homogeneização dessa mistura, imprimindo-se à placa movimentos circulares e após a solidificação do ágar vertia-se mais 3 ml do mesmo meio fundido e resfriado, cuja finalidade, era bloquear a entrada do oxigênio do meio ambiente e, por conseguinte, auxiliar no isolamento do anaeróbio em estudo.

Após a solidificação da camada adicional do ágar, as placas eram incubadas a 37°C durante 24 - 48 horas em anaerobiose, utilizando-se o sistema Gaspak (BBL). A constagem e isolamento de colônias suspeitas foi realizada segundo o ICMSF (13) e CERQUEIRA - CAMPOS (3), e a identificação das cepas isoladas através das seguintes provas: prova da atividade hemolítica (10), prova de Nagler (13), provas de fermentação da lactose e hidrólise de gelatina (13), provas de redução de nitrato e de motilidade (13).

Salmonella:

De cada amostra de lingüiça 25 g do seu conteúdo era adicionada, assepticamente, a 225 ml de água peptonada tamponada pH 7,2 esterilizada e homogeneizada através de agitação manual, seguido de incubação a 37°C por 16 - 20 horas (13), isto correspondendo a etapa de pré-enriquecimento dessa bactéria segundo VAN SCHOTENST & VAN LEUSDEN (33). Em seguida, era efetuado o enriquecimento seletivo das culturas utilizando-se caldo selenito-cistina-novobiocina (25) e caldo tetracionato bile-verde brilhante, ambos por 24 a 48 horas a temperaturas de 37°C e 43°C.

O isolamento das Salmonelas foi efetuado através dos meios de cultura, ágar verde brilhante (13) e ágar xilose & lisina e desoxicolato (4), em placas, incubadas a 37°C por 24 horas. A identificação das colônias suspeitas foram feitas através do meio de Rugai e Lisina - motilidade (IAL) (24), e provas bioquímicas adicionais; fermentação de carboidratos: glicose, lactose, manitol e sacarose (5, 13), utilização de malonato (19), utilização de citrato (32). Em seguida, as cepas com características de *Salmonella* foram identificadas através de provas sorológicas através do soro polivalente "O" (sérico) e "H" (flagelar) ambos anti-salmonelas. Aquelas cepas que apresentaram positividades frente a esses soros polivalentes, foram enviadas à Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, onde foi realizada a identificação dos sorótipos de Salmonelas isolados, por gentileza e colabora-

ção do Dr. Carmo Elias Andrade Melles.

3 RESULTADOS

As análises foram efetuadas conforme planejadas na pesquisa, ou seja: a contagem de Staphylococcus aureus e verificação da produção de enterotoxinas pelas cepas isoladas, contagem de Bacillus cereus, contagem de Clostridium perfringens do tipo A e a pesquisa de bactérias do gênero Salmonella, cujos resultados são descritos a seguir.

Na Tabela 1, encontra-se a distribuição das 60 amostras de linguiça fresca examinadas, segundo a categoria das feiras livres; B(6), C(35), E(19) e a amplitude da variação do número de S. aureus, B. cereus e C. perfringens tipo A obtidos.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE LINGÜIÇA FRESCA EXAMINADAS, SEGUNDO A CATEGORIA DAS FEIRAS LIVRES E A AMPLITUDE DA VARIAÇÃO DAS CONTAGENS DOS MICRORGANISMOS PESQUISADOS - SÃO PAULO - 1985

CATEGORIA DE FEIRAS LIVRES	AMOSTRAS DE LINGÜIÇA EXAMINADAS	VALORES	UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS/g		
			<u>Staphylococcus aureus</u>	<u>Bacillus cereus</u>	<u>Clostridium perfringens</u> A
B	6	mínimo	<50	<100	<10
		máximo	1.550	<100	510
C	35	mínimo	<50	<100	<10
		máximo	40.000	670	900
E	19	mínimo	<50	<100	<10
		máximo	20.000	2.500	4.000
TOTAL	60	mínimo	<50	<100	<10
		máximo	40.000	2.500	4.000

Os resultados das contagens para o total das amostras analisadas variaram de <50 a 4 x 10⁴/g para S. aureus, <10² a 2,5 x 10³ / g para B. cereus e <10 a 4 x 10³/g para C. perfringens tipo A.

A Tabela 2, mostra as 60 amostras de linguiça fresca, distribuídas segundo intervalos de classe, contagens de C. perfringens tipo A, B. cereus e S. aureus (com tipos de enterotoxinas) por grau de material examinado.

As primeiras classes, de 0|—— 10, 0|—— 10² e 0|—— 5 x 10, correspondentes a C. perfringens tipo A, B. cereus e S. aureus, respectivamente, encerram as amostras, consideradas negativas, para a presença dessas bactérias, nas análises efetuadas e isto se relaciona à própria metodologia empregada. Segundo os

TABELA 2 - NÚMERO E PORCENTAGEM DAS 60 AMOSTRAS DE LINGUICA FRESCA DISTRIBUÍDA SEGUNDO INTERVALOS DE CLASSE, *Clostridium perfringens* A, *Bacillus cereus* E *Staphylococcus aureus* (COM TIPOS DE ENTEROTOXINAS) POR GRAMA DE MATERIAL EXAMINADO - SÃO PAULO - 1985

Nº/GRAMA	<i>Clostridium perfringens</i> A			<i>Bacillus cereus</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			
	AMOSTRAS	Nº/GRAMA	AMOSTRAS	Nº/GRAMA	AMOSTRAS	Nº/GRAMA	AMOSTRAS	Nº/GRAMA	AMOSTRAS	CERAS ENTERO TOXICÓGENICAS
Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	TIPO
0 — 10	53	88,3	0 — 10	54	90,0	0 — 5x10	8	13,3	—	
10 — 10 ²	—	—	10 ² — 10 ³	5	8,3	5x10 — 10 ²	7	11,7	1	AB
10 ² — 10 ³	6	10,0	10 ³ — 10 ⁴	1	1,7	10 ² — 10 ³	26	43,4	3	B,B,C
10 ³ — 10 ⁴	1	1,7				10 ³ — 10 ⁴	11	18,3	—	
						10 ⁴ — 10 ⁵	8	13,3	—	
T O T A L	60	100,0		60	100,0		60	100,0	4	B,B,C,AB

métodos usados, o encontro de uma colônia na primeira placa de contagem, correspondia a 10/g de C. perfringens tipo A, 100/g de B. cereus e 50/g de S. aureus dado que a diluição inicial do alimento analisado foi de 10⁻¹ e os inóculos foram de 1 ml, 0,1 ml e 0,2 ml, respectivamente.

Das amostras positivas, 6 (10%) revelaram-se com contagens compreendidas entre 10² e 10³ exclusive, e uma (1,7%) entre 10³ e 10⁴ de C. perfringens tipo A exclusive por grama, 5 (8,3%) entre 10² e 10³ exclusive por grama e uma (1,7%) entre 10³ e 10⁴ exclusive de B. cereus por grama. Com relação a S. aureus, 7 amostras (11,7%) revelaram-se com contagens por grama, entre 5 x 10 e 10² exclusive, 26 (43,4%) entre 10² e 10³ exclusive, 11 (18,6%) entre 10³ e 10⁴ exclusive e 8 (13,3%) entre 10⁴ e 10⁵ exclusive.

De 52 cepas de S. aureus, sendo uma de cada amostra positiva para essa bactéria, 4 revelaram-se enterotoxigênicas, sendo produtoras de enterotoxina dos tipos B, B, C e AB, respectivamente.

A Tabela 3, mostra a positividade para S. aureus, B. cereus, C. perfringens tipo A e Salmonella sp., nas 60 amostras de linguiça fresca, analisadas. Do total de amostras estudadas, 52 (86,7%) foram positivas para S. aureus, 6 (10,0%) para B. cereus, 7 (11,7%) para C. perfringens tipo A e 8 (13,3%) para bactérias do gênero Salmonella.

TABELA 3 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE POSITIVIDADE DE S. aureus, B. cereus, C. perfringens A E Salmonella sp EM 60 AMOSTRAS DE LINGUIÇA FRESCA, SÃO PAULO - 1985

AMOSTRAS	MICRORGANISMOS PESQUISADOS							
	<u>S. aureus</u> Nº	<u>S. aureus</u> %	<u>C. cereus</u> Nº	<u>C. cereus</u> %	<u>C. perfringens</u> Nº	<u>C. perfringens</u> %	<u>B. cereus</u> Nº	<u>B. cereus</u> %
Positivas	52	86,7	06	10,0	07	11,7	08	13,3
Negativas	08	13,3	54	90,0	53	88,3	52	86,7
TOTAL	60	100,0	60	100,0	60	100,0	60	100,0

A Tabela 4, apresenta as amostras analisadas, distribuídas segundo a categoria das feiras livres de origem e a positividade para S. aureus, B. cereus, C. perfringens tipo A e Salmonella sp. Para a categoria A, das 6 amostras examinadas, 5 (83,3%) foram positivas para S. aureus, 1 (16,7%) para C. perfringens tipo A e 1 (16,7%) para Salmonella sp. Das 35 amostras do alimento analisadas das feiras livres da categoria B, das 30 (85,7%) foram positivas para S. aureus, 2 (5,7%) para B. cereus, 3 (8,6%) para C. perfringens tipo A e 7 (20%) para salmonelas. Quanto as 19 amostras

da categoria E examinadas, de 17 (89,5%) foram isoladas cepas de S. aureus, de 4 (21%), cepas de B. cereus e de 3 (15,8%), cepas de C. perfringens tipo A.

A Tabela 5 apresenta o número e porcentagem de amostras de linguiça fresca positivas para salmonelas, segundo os sorótipos isolados. Das 8 (13,3%) amostras positivas foram isoladas cepas de 5 sorótipos diferentes distribuídos da seguinte maneira: de 1 (12,5%) amostra isolou-se a Salmonella panama, de 1 (12,5%) Salmonella anatum e de 2 (25,0%) a Salmonella agona.

TABELA 5 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE AMOSTRAS DE LINGÜIÇA FRESCA POSITIVAS PARA SALMONELAS, SEGUNDO SORÓTIPOS ISOLADOS SÃO PAULO - 1985

SORÓTIPOS ISOLADOS	AMOSTRAS POSITIVAS	
	Nº	%
<u>Salmonella panama</u>	1	12,5
S.I 4,5,12:i:-	1	12,5
<u>Salmonella bredeney</u>	2	25,0
<u>Salmonella anatum</u>	2	25,0
<u>Salmonella agona</u>	2	25,0
 TOTAL	 8	 100,0

A Tabela 6 revela o número e porcentagem de amostras de linguiça fresca positivas, distribuídas segundo a positividade para as bactérias patogênicas pesquisadas. Do total de amostras analisadas, 55 (91,7%) revelaram-se positivas para as espécies bactéria nas pesquisadas, isoladamente ou em associação.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Com relação à presença de microrganismos patogênicos em produtos cárneos, incluindo linguiças, muitos estudos têm sido realizados a respeito e alguns deles podem ser referidos, a fim de serem os seus resultados comparados com os obtidos na presente investigação. Assim, ASSUMPCÃO realizou a pesquisa de salmonelas em 84 amostras de produtos elaborados com carne suína, vendidos em São Paulo - SP., sendo 13 linguiça fresca. Nestas, constatou em 15,4% a presença de Salmonella newport (1).

PESTANA & RUGAI desenvolveram uma pesquisa com amostras de linguiça constituída de carne de porco e mistas, salsichas e mortadelas e das 170 amostras examinadas, 6 (3,2%) foram positivas para salmonelas, sendo isolados os seguintes sorótipos: Salmonella

TABELA 6 - NÚMERO E PERCENTAGEM DE AMOSTRAS DE LINGUICA FRESCA POSITIVAS, DISTRIBUÍDAS SEGUNDO A PRESENÇA DE UM OU MAIS DOS MICRORGANISMOS PESQUISADOS - SÃO PAULO - 1985

M I C R O R G A N I S M O S	A M O S T R A S P O S I T I V A S	
	Nº	%
<u>S</u> . <u>aureus</u>	36	60,0
<u>C</u> . <u>perfringens</u> A	1	1,7
<u>B</u> . <u>cereus</u>	1	1,7
<u>S</u> . <u>aureus</u> + <u>C</u> . <u>perfringens</u> A	4	6,6
<u>S</u> . <u>aureus</u> + <u>B</u> . <u>cereus</u>	4	6,6
<u>S</u> . <u>aureus</u> + <u>S</u> . <u>bredeney</u>	2	3,3
<u>S</u> . <u>aureus</u> + <u>S</u> . <u>agona</u>	2	3,3
<u>S</u> . <u>aureus</u> + <u>S</u> . <u>anatum</u>	1	1,7
<u>S</u> . <u>aureus</u> + <u>S</u> . <u>panama</u>	1	1,7
<u>S</u> . <u>aureus</u> + <u>S</u> . <u>I4,5,12:i:-</u>	1	1,7
<u>C</u> . <u>perfringens</u> A + <u>S</u> . <u>anatum</u>	1	1,7
<u>S</u> . <u>aureus</u> + <u>B</u> . <u>cereus</u> + <u>C</u> . <u>perfringens</u> A	1	1,7
TOTAL	55	91,7

Porcentagem calculada sobre as 60 amostras analisadas

S. anatum, S. newport e S. minnesota (26).

GALTON et al., em 217 amostras de lingüiça fresca estudadas constataram em 51 (23,5%) a presença de salmonelas. Destas, foram isolados os sorótipos: S. derby, S. anatum, S. bideney, S. münnchen, S. newport, S. cholerae suis, S. typhimurium, S. meleagridis, S. newington, S. thomasville, S. montevideo, S. tallahassee, S. kentucky, S. give, S. atlanta, S. carrau, S. californica e S. tennessee (7).

POLO na Espanha, estudou 200 amostras de produtos cárneos embutidos crus e isolou cepas de Salmonela em 12 (6%), pertencentes ao sorótipos: S. bovis morbillifans, S. münnchen e S. manhattan. Neste trabalho também foram isoladas bactérias do gênero Arizona em 3 (1,5%) amostras (27).

WEISSMAN & CARPENTER realizaram estudo no qual analisaram amostras de lingüiças de carne suína, sendo 81 frescas e 11 defumadas. Obtiveram o isolamento de Salmonelas em 31 (38,3%) e 1 (9,0%) respectivamente (35).

MORENO et al examinaram 60 amostras de vários produtos cárneos embutidos, expostos à venda na cidade de São Paulo e, particularmente, das 15 amostras de lingüiça fresca suína, isolaram Escherichia coli em 60%, Aerobacter aerogenes em 67,7% e Salmonella em 46,7% (22).

FALCÃO et al isolaram salmonelas em 3 (15%) de 20 amostras de lingüiça fresca analisadas, vendidas na cidade de Araraquara-SP. (6).

ROBBS & ROBBS no Estado do Rio de Janeiro, de 31 amostras de lingüiça, cozidas e/ou defumadas analisadas, isolaram Staphylococcus aureus em 15 (48,4%) e Clostridium perfringens em 1 (3,2%) (30).

LEITÃO analisou 68 amostras de lingüiça fresca de carne de porco vendidas no comércio da cidade de Campinas - SP., das quais 16 (23,5%) revelaram-se positivas para as bactérias do gênero Salmonella. Das amostras positivas, constatou a presença de S. anatum em 10 (65,2%), de S. anatum + Salmonella sp em 1 (6,2%) e de S. anatum + S. derby em 5 (31,3%). Assim, de todas as amostras positivas, o referido autor isolou cepas de S. anatum (20).

CERQUEIRA-CAMPOS pesquisou bactérias responsáveis por toxinfecções alimentares (Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium perfringens e salmonelas) em 50 amostras de carne moída comercializada em São Paulo - SP. e isolou de 22 (44,0%) cepas de S. aureus, de 9 (18,0%) B. cereus, de 9 (18,0%) C. perfringens e de 7 (14,0%) cepas de Salmonellas sp. Do total das amostras estudadas verificou a presença de cepas pertencentes a pelos menos uma das espécies bacterianas pesquisadas em 31 (62%) (2).

RUDGE examinou 231 amostras de lingüiça fresca vendidas na cidade de Botucatu - SP. e verificou em 50 (21,6%), a presença de cepas de Staphylococcus aureus e em 18 (7,8%) de Clostridium perfringens (31).

LACERDA em São Paulo - SP., analisou 50 amostras de morcela exposta à venda e obteve o isolamento de Staphylococcus aureus em 29 (58,0%) (17).

No presente trabalho, foi também incluída a quantificação de algumas bactérias patogênicas, como *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens*, assim como a pesquisa de salmonelas, para se constatar o possível potencial de risco que o alimento examinado poderia apresentar, com relação a estas bactérias, especificamente.

Através da análise da Tabela 6, verifica-se nesta pesquisa, que uma mesma amostra de linguiça fresca pode estar contaminada, concomitantemente, com mais de uma espécie bacteriana, responsáveis por toxinfecções alimentares. Assim, das 60 amostras examinadas, em 55 (91,7%) detectou-se a presença de uma ou mais bactérias patogênicas pesquisadas. É importante salientar que 1 (1,7%) foi positiva para 3 dos 4 agentes pesquisados e 16 (26,7%) para dois agentes; em 38 (63,3%) constatou-se a presença de apenas um dos patógenos investigados. Sendo que de 1 (1,7%) isolou-se *B. cereus*, de 1 (1,7%) *C. perfringens* e de 36 (60%) isolou-se cepas de *S. aureus*, sugerindo este último resultado uma possível grande participação dos manipuladores na contaminação do alimento analisado. Desse modo, analisando-se os resultados obtidos com referência aos agentes bacterianos pesquisados, todos de reconhecida participação na etiologia de toxinfecções alimentares, verifica-se na Tabela 3 que das 60 amostras estudadas, obteve-se o isolamento de *S. aureus* em 52 (86,7%). Esse resultado quando comparado com os observados por alguns autores, mostra que a positividade para essa bactéria foi superior à de 48,4% verificada por ROBBS & ROBBS (30), 21,6% por RUDGE (31) e 58% por LACERDA (17), em produtos cárneos embutidos. O resultado encontrado neste trabalho evidencia, possivelmente, uma grande participação dos manipuladores na contaminação do alimento em estudo, já que o homem é a principal fonte de contaminação de alimentos por essa bactéria (14). Como já referido, é também seu principal reservatório (22), podendo albergá-la na pele, secreções oronasais e fezes (13). Vale ressaltar, no entanto, que o alimento pode ter a sua contaminação proveniente da matéria-prima utilizada na sua preparação como também, do ambiente onde foi preparado, podendo portanto, esse conjunto, ter participação na sua contaminação tanto por *S. aureus*, como pelos outros microrganismos pesquisados.

Quanto ao *B. cereus*, existem poucos trabalhos realizados sobre esta bactéria em alimentos cárneos, sendo a sua grande maioria fetuado, principalmente, em produtos desidratados. Merece entretanto destaque, o trabalho desenvolvido por CERQUEIRA-CAMPOS em São Paulo - SP., que isolou essa bactéria de carne moída em 18% das amostras analisadas. Comparando-se esses resultados com o do presente trabalho, mostrado na Tabela 3, verifica-se que o mesmo foi superior em 8%. Diferentemente de *S. aureus*, o encontro desse microrganismo em alimentos cárneos, particularmente, em linguiça, denota a participação na sua contaminação, principalmente do ambiente, ao invés do seu manipulador, apesar desta bactéria já ter sido isolada das fezes, de 14 a 15% de indivíduos saudáveis (15).

Quanto ao *Clostridium perfringens*, verifica-se através dos resultados apresentados na Tabela 3, que este microrganismo foi isolado em 7 (11,7%) do total das amostras de linguiça fresca analisadas. Este resultado embora baixo, mostrou-se superior aos obtidos por ROBBS & ROBBS (30) e RUDGE (31), ou seja, de 3,2% e 7,8% respectivamente.

Da mesma forma que para o *B. cereus*, a fonte provável de contaminação desse alimento pelo *C. perfringens*, pode ter tido pouca ou nenhuma participação direta do manipulador. A sua origem deve ter sido, principalmente, fezes de animais que pode ter contaminado a carne utilizada como matéria-prima na preparação do embutido, de forma endógena ou exógena, ocorrida durante as operações de abate. Entretanto, deve-se ressaltar que, HALL & HAUSER (11) verificaram que 78,1% dos manipuladores de alimentos, por eles estudados, excretavam o *C. perfringens* através de suas fezes, percentual este bastante elevado e considerável.

Ainda analisando-se a Tabela 3, verifica-se que a positividade para *Salmonella* foi de 8 (13,3%) em relação ao total das amostras de linguiça fresca examinada. Comparando-se este resultado com os obtidos pelos autores citados, verifica-se que o mesmo foi superior aos constatados por PESTANA e RUGAI (26) e POLO (27), semelhante aos de ASSUMPÇÃO (1) e FALCÃO et al (6), sendo no entanto, inferior aos constatados por GALTON et al (7) WEISSMAN & CARPENTER (35), MORENO et al (22) e LEITÃO (20).

Como já referido, os alimentos podem se contaminar por esta bactéria através do material fecal do homem ou animal, incluindo desde as matérias-primas utilizadas até a obtenção do produto acabado, assim como no armazenamento, transporte e comercialização em condições precárias de higiene.

Verifica-se através da Tabela 5 que das 8 (13,3%) amostras de alimentos, positivas para *Salmonella*, foram isoladas cepas pertencentes a 5 sorótipos diferentes dessa bactéria, sendo 2 (25%) de *S. anatum*, 2 (25%) de *S. bredeney*, 2 (25%) de *S. agona*, 1 (12,5%) de *S. panama* e 1 (12,5%) de *S. I 4, 5, 12:i:-*. Comparando-se estes resultados com os encontrados por alguns dos autores citados, verifica-se que a partir de linguiça fresca, a *S. anatum* e *S. bredeney* foram também isoladas por GALTON et al (7) e que a *S. anatum* foi isolada por LEITÃO (20) de todas as amostras positivas para salmonelas por ele obtidas.

Cumpre salientar por outro lado, que CERQUEIRA-CAMPOS (2) também isolou cepas deste sorótipo, da maioria de suas amostras de carne moída positivas para salmonelas.

O encontro de diversidade de sorótipos observados neste trabalho, assim como, nos de outros pesquisadores, mostra a importância epidemiológica que este alimento representa na disseminação desse microrganismo causador de toxininfecção alimentar.

Com relação aos números obtidos dos diversos patógenos pesquisados, analisando-se a Tabela 1, pode-se constatar que os valores mínimos e máximos das contagens de *S. aureus*, *B. cereus* e *C. perfringens* mostraram-se com grande variação, sobretudo nas amostras que foram adquiridas nas feiras das categorias C e E. Considerando-se, entretanto o total de amostras analisadas, tais valores por grama do alimento foram de <50 e 4×10^4 para *S. aureus*, <100 e $2,5 \times 10^3$ para *B. cereus* e <10 e 4×10^3 para *C. perfringens*.

Por outro lado, analisando-se a Tabela 2, pode-se constatar que os valores das contagens revelaram-se de forma geral não muito elevados, considerando-se que, para causarem sintomas de toxin-

fecção alimentar, devem atingir, geralmente, números da ordem de 10^6 ou mais por grama (13). Assim, apenas uma amostra revelou-se com 10^3 ou mais de *C. perfringens*/g e uma com 10^3 ou mais de *B. cereus*/g, porém, em ambos o número destas bactérias não excede de 10^4 /g. Entretanto, com relação ao *S. aureus*, os números encontrados foram superiores aos verificados para *C. perfringens* e *B. cereus*; 19 (31,6%) continham 10^3 ou mais de *S. aureus*/g do alimento, mas em 8 (13,3%) as contagens desta bactéria atingiram valores de 10^4 ou mais; porém inferiores a 10^5 /g.

Apesar dos valores das contagens serem não muito elevados e considerando-se que o alimento analisado é normalmente, consumido a pós cocção, ainda persiste a possibilidade de risco ao consumidor. Se o processo de cocção for bem utilizado, obtém-se a destruição de, praticamente, todas as formas vegetativas de bactérias patogênicas, porém, se for empregado aquecimento com temperaturas subletais, bactérias patogênicas podem sobreviver e isto é mais patente quando se trata de formas esporuladas de *C. perfringens* e *B. cereus*. Assim, após o tratamento pelo calor, dependendo das condições em que o referido alimento foi mantido, pode ocorrer além da contaminação de outros alimentos, também a multiplicação desses patógenos atingindo números altos suficientes para ocasionarem sintomatologia de toxinfecção alimentar em consumidores. É importante salientar, também, que o alimento se mostrou contaminado com *S. aureus* produtor de enterotoxina, havendo condições favoráveis para a sua multiplicação, ocorrerá a produção desta toxina, que poderá resistir ao tratamento térmico através da cocção.

No presente estudo, 52 cepas de *S. aureus*, foram selecionadas, sendo uma de cada amostra positiva para estafilococos. A este respeito, analisando-se a Tabela 2, constata-se que 4 cepas, correspondentes a 7,69% das amostras positivas de *S. aureus* e 6,7% do total examinado, revelaram-se enterotoxigênicas, sendo 2 produtoras de enterotoxina do tipo B, uma do C e uma dos tipos A e B, concomitantemente. Verifica-se ainda nesta tabela, que as cepas enterotóxicas foram isoladas de amostras que continham no máximo entre 10^2 e 10^3 *S. aureus* por grama do alimento, não representando, pelo menos no momento em que o produto foi analisado, risco iminente de ocasionar sintomas de intoxicação alimentar estafilocócica.

Deve-se salientar que já foram realizados alguns poucos estudos sobre o isolamento de *S. aureus* produtores de enterotoxinas, em alimentos cárneos embutidos ou não. Assim RUDGE, na cidade de Boituva - SP., isolou duas cepas dessa bactéria produtora, respectivamente, de enterotoxinas dos tipos A e C, de linguiça fresca comercializada naquela localidade (31). HIROOKA & MILLER, em Londrina - PR., de embutidos cárneos, inclusive linguiça fresca e salsicha, de 75 cepas dessa bactéria verificaram que 62,5% eram produtoras de enterotoxina do tipo A (12,5%) do B (15,6%) do C, (6,25%) do E, (3,12%) e dos A e C, concomitantemente (12). Por outro lado CERQUEIRA-CAMPOS e IARIA em São Paulo - SP., isolaram de amostras de carne moída e constataram que 5 (10%) revelaram-se com cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas, sendo 2 (4%) com cepas produtoras de enterotoxina do tipo A, 1 (2%) do B, 1 (2%) do D, 1 (2%) dos tipos A e C, concomitantemente.

Abstract

Were studied sixty samples of fresh sausage collected at an equal numbers of open markets in São Paulo, Brazil, with the finality to detect food poisonings agents. Was made a qualitative and quantitative study enterotoxigenic with *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* A and *Salmonella*. From 55 (91,7%) samples was detected one or more these bacterias, being the *S. aureus* in 52 (86,7%), *B. cereus* in 6 (10%), *C. perfringens* A in 7 (11,7%) and *Salmonella* in 8 (13,3%). The results quantitative of *S. aureus* show a variation from <50 to 40.000, *B. cereus* <100 to 2.500 and *C. perfringens* A <10 to 40.000, all these results per grame by examined food. From 52 *S. aureus* strains, selected, was studied to verification the enterotoxigenic capacity, being 4 (7,65%) possible; 2 enterotoxin type B, 1 type C and 1 A and B concomitantly.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 ASSUMPÇÃO, L. Pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella* em carnes e seus derivados vendidos a retalho. *Arq.Hig.*, São Paulo, v. 11, p. 475-86, 1946.
- 02 CERQUEIRA-CAMPOS, M.L. *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium perfringens e bactérias do gênero Salmonella em carne moída, vendida no Município de São Paulo - SP*. São Paulo, 1980. Tese, doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 03 CERQUEIRA-CAMPOS, M.L., IARIA, S.T. Contagem de *Staphylococcus aureus* em carne moída e verificação da produção de enterotoxina pelas cepas isoladas. São Paulo. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 12, São Paulo. 1983. *Programa e resumos...* São Paulo : Associação Latino-Americana de Microbiologia/Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983. p. 146.
- 04 DIFCO manual. *Dehydrated culture media and reagents for microbiology*. 10.ed. Detroit Michigan, 1984.
- 05 EDWARDS, P.R., EWING, W.H. *Identification of enterobacteriaceae*. 3.ed. Minneapolis : Burgess, 1972. p. 363.
- 06 FALCÃO, D.P. et al. Microrganismos em alimentos cárneos crus embutidos. *R.dia Fac.Ciêns.Farm.*, Araraquara, v. 1, p. 39-48, 1978.
- 07 GALTON, M.M. et al. *Salmonella* in fresh and smoker pork sausage. *J.Infect.Dis.*, v. 95, p. 232-5, 1954.
- 08 GEOPFERT, J.M. *Bacillus cereus*. In: SPECK, M.L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington : APHA/Inter-Society/Agency Committee on Microbiological Methods for Foods, 1976. p. 417-23.
- 09 GORDON, R.E., HAYES, W.C., PANG, C.H. *The genus Bacillus*. S.l. : Dept. Agric. Handb. 1973. 283 p.
- 10 HALL, H.E., ANGELOTTI, R., LEWIS, K.H. Quantitative detection of staphylococcal enterotoxin B in food by gel-diffusion methods. *Public Health Rep.*, v. 78, p. 1089-98, 1963.

- 11 HALL, H.E., HAUSER, G.H. Examination of faeces from food handlers for *Salmonellae*, *Shigellae* enteropathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol., v. 14, p. 928-33, 1966.
- 12 HIROOKA, E.Y., MULLER, E.E. Isolamento, caracterização e enterotoxigenicidade de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos cárneos comercializados em Londrina - Pr. Cienc.Tecnol.Aliment., v. 2, p. 123-33, 1982.
- 13 INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microorganism in foods. 1. Their significance and methods of enumeration. 2. ed. Toronto : University of Toronto Press, 1978. 434 p.
- 14 JAY, J.M. Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza : Acribia, 1973. p. 190-209.
- 15 JOHNSON, K.M. *Bacillus cereus* food-borne illness: an update. J.food Protect., v. 42, p. 145-53, 1984.
- 16 KNISELY, R.F. Differential media for the identifications of *Bacillus anthracis*. J.Bact., v. 90, p. 1178-83, 1965.
- 17 LACERDA, A.A. Alguns grupos de microrganismos em morcelas vendidas no Município de São Paulo. Dissertação, Mestrado. São Paulo, 1982. 148 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- 18 LACHICA, R.V.F. et al. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting nucleic and staphylococcal activity. Appl. Microbiol., v. 21, p. 585-7, 1971.
- 19 LEIFSON, E. The fermentation of sodium malonate as means of differentiating *Aerobacter* and *Escherichia*. J.Bact., v. 26, p. 329-30, 1983.
- 20 LEITÃO, M.F.F. Salmonelas em águas fluviais e em alimentos não processados e industrializados de origem animal e vegetal no Estado de São Paulo. Tese, Doutorado. São Paulo, 1979. 243 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- 21 MORENO, G., PANETA, J.C., BOTTINO, J.A. Isolamento de entrobactérias a partir de produtos cárneos embutidos. Arg. Inst.Biol., São Paulo, v. 36, p. 191-6, 1979.
- 22 MUNCH-PETERSEN, E. Staphylococcal carriage in man: an attempt at a quantitative survey. Bull. W.H.O., v. 24, p. 761, 1961.
- 23 _____. Staphylococci in food and food intoxication a review and a appraisal on phage typing results. J.Food Sci., v. 28, p. 692-710, 1963.
- 24 PESSOA, G.V.A. Sobre a ocorrência de uma variante de *Salmo-nella typhimurium* fermentadora da lactose. São Paulo, 1972. 152 p. Tese, Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

- 25 PESSOA, G.V.A., PEIXOTO, E.S. Caldo-selenito-novobiocina: um meio de maior seletividade para o isolamento de *Salmonella* de fezes. R.Inst. Adolfo Lutz, v. 31, p. 1-3, 1971.
- 26 PESTANA, B.R., RUGAI, E. Da presença de salmonelas nas carnes preparadas. R.Inst. Adolfo Lutz, v. 7, p. 5-7, 1947.
- 27 POLO, A.M. Estudio microbiológico y epidemiológico de los germenés de la familia "Enterobacteriaceae" en los productos cárneos. R.Iberia Parasitol. Inst. Lopez Neyra Parasitol. v. 20, p. 345-96, 1960.
- 28 QUEVEDO, F. Normalización de alimentos y salud para América Latina y el Caribe. 3. Importância de los criterios microbiológicos. B.Ofic.Sanit.Panam., v. 99, n. 6, 1985.
- 29 ROBBINS, R., GOULD, S., BERGSOLL, M.S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. Appl. Microbiol., v. 28, p. 946-50, 1974.
- 30 ROBBS, N.K., ROBBS, P.G. Condições microbiológicas de produtos comercializados no Rio de Janeiro. R.Microbiol., v. 10, p. 92-6, 1979.
- 31 RUDGE, A.C. Aspectos microbiológicos e sanitários de linguiça tipo frescal: análise da contaminação por Staphylococcus aureus e Clostridium perfringens. Botucatu, 1980. 80 p. Tese, Livre Docência. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- 32 SIMMONS, J.S. A culture medium for differentiating organism of Typhoid - Colon group and for isolation of certain fungi. J.Infect.Dis., v. 39, p. 209-14, 1926.
- 33 VAN SCHOOTERST, M., VAN LEUSDEN, F.M. Studies on the isolation of injured salmonellae from foods. Zentralbatt für Bakteriologie, Parasitenkunde Infectionen Krankheiten und Hygiene Abt. I.Orig., v. 221, p. 19-29, 1972.
- 34 VASCONCELOS, J.C., IARIA, S.T. Condições microbiológicas (higiênico-sanitárias) das linguiças frescas comercializadas em feiras livres no Município de São Paulo - SP. I. Indicadores de contaminação. B.CEPPA, Curitiba, v. 9, n. 1, p.64-75, jan./jun.1991.
- 35 WEISSMAN, M.A., CARPENTER, J.A. Incidence of *Salmonellae* in meat and meat products. Appl.Microbiol., v. 28, p. 618-622, 1969.