YOLANDA SILVA CAMPS

NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) DE COLIFORMES FECAIS
E ESTREPTOCOCOS FECAIS E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS
DO GÊNERO SALMONELLA E CLOSTRIDIUM PERFRINGENS
DE ÁGUA DE ESCALDAMENTO EM UM MATADOURO DE SUÍNOS,
SÃO PAULO, 1981 - 1982

Tese apresentada ao Departamento
de Nutrição da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São
Paulo para obtenção do título
"Doutor em Saúde Pública".

Orientador: Prof. Dr. Donald Wilson

A meu pai, "In Memoriam", com a dor de já não tê-lo entre nós.

Ao meu esposo MANOEL, pelo seu apoio, serenidade e conhecimentos que me ofereceu durante o desenvolvimento deste trabalho e, especialmente, na fase de redação e datilografia do mesmo.

À minha mãe, irmãos e sobrinhos, longe, porém sempre em minha lembrança.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Dr.

SEBASTIÃO TIMO IARIA, que tem sido o professor e o amigo de todas as horas.

Minha gratidão:

por seus amplos ensinamentos, dedicação constante e, especialmente, sua inestimável amizade.

MINHA ETERNA GRATIDÃO

Ao

PROFESSOR DOUTOR DONALD WILSON

pela sua orientação, ensinamentos e confiança oferecidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

UMA LEMBRANÇA ESPECIAL:

"PARA MI PEQUEÑA PATRIA NATAL Y PARA SU SUFRIDO
Y AGUERRIDO PUEBLO, QUE HOY CAMINA HACIA NUEVOS
HORIZONTES."

PARA MINHA GRANDE PÁTRIA DE ADOÇÃO E PARA SEU POVO
E INSTITUIÇÕES, QUE ME PERMITIRAM REALIZAR
OS SONHOS PROFISSIONAIS E INDIVIDUAIS.

AGRADECIMENTOS

Com a apresentação deste trabalho, desejamos expressar nossos sinceros agradecimentos às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com esta realização.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, que nos permitiu o uso de seus laboratórios do Setor de Saúde Pública, para a realização de maior parte desta pesquisa, e às suas professoras:

Dra. MARIA LÚCIA CERQUEIRA CAMPOS, pela sua inestimável amizade, apoio e ensinamentos em todas as ocasiões;

Dra. SIRDÉIA M. PERRONE FURLANETTO, pelo apoio demonstrado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. EDUARDO DO NASCIMENTO MÓS, responsável pelo Setor de Medicina Veterinária do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, que nos permitiu o uso de seu laboratório para realizar a pesquisa-piloto e parte de nosso trabalho, e aos docentes:

Dr. MANOEL ARMANDO DOS SANTOS, pelos seus ensinamentos relativamente ao isolamento do C. perfringens e ao Dr. R. YANAGUITA, pelas suas sugestões no desenvolvimento da pesquisa-piloto.

Ao Prof. Dr. GIL VITAL ALVAREZ PESSÔA, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pela identificação dos sorotipos de Salmonella isolados nesta pesquisa.

À Dra. MARIA THEREZINHA MARTINS, Gerente do Laboratório de Microbiologia da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), pela sua ajuda inestimável na escolha dos métodos de concentração da água empregados nesta pesquisa.

Aos Técnicos de Laboratório JOSÉ MARIA GODOY, ROSA ALEXANDRINA DE OLIVEIRA, MARIA ALICE DE OLIVEIRA DA SILVA e a Auxiliar JOSEFA BLACHECHEN, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela ajuda prestada durante a realização deste trabalho.

Ao Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Poins da Grande São Paulo, do Ministério da Agricultura,

pela grande ajuda prestada, permitindo a colheita das amostras de água de esaldamento de suíno na indústria estudada.

À Bibliotecária MARIA CECÍLIA GONZAGA FERREIRA, da Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública da USP, pela grande ajuda na ordenação das referências bibliográficas, apresentadas nesta publicação.

Às minhas amigas de São Paulo, MYRIAM McLAUGHLIN e GUMERCINDA MIÑARRO, pela sua inestimável ajuda na correção deste trabalho.

Aos meus amigos de Uruguay, Sra. ELENA DE OLIVEIRA MIRANS e ROBERTO PIAGGIO, pelo seu apoio generoso na solução de meus problemas nesse país.

Enfim, a nossa sincera gratidão a todos os que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização desta Tese.

RESUMO

Foram determinados os NMP/100 ml de bactérias coliformes fecais e estreptococos fecais e foi realizada a pesquisa de bactérias do gênero Salmonella e de C. perfringens, em águas de escaldamento de um matadouro de suínos, situado no Município de Carapicuíba, Estado de São Paulo, Brasil. Foram registrados a temperatura e o pH de cada amostra por serem estes, fatores fundamentais para a sobrevivência bacteriana.

Os NMP/100 ml da amostra variaram de ≤ 3 a $4,3 \times 10^3$ para coliformes fecais e de $2,3 \times 10$ a $1,1 \times 10^6$ para estreptococos fecais.

Isolaram-se bactérias do gênero Salmonella de 6% das 50 amostras estudadas e Clostridium perfringens tipo A de 40% das 25 amostras pesquisadas.

Conclui-se que o tanque de escaldamento pode ser uma importante fonte de contaminação da carcaça de suínos, sendo necessário instituir uma legislação, baseada em critérios epidemiológicos, relativa ao processo de abate em geral e sobre o uso do tanque em particular.

ÍNDICE

	pág.
1. INTRODUÇÃO.	1
2. OBJETIVOS.	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.	18
3.1. Procedência da amostra.	18
3.2. Colheita e transporte das amostras de água.	18
3.3. Determinação do NMP de bactérias coliformes de ori <u>g</u> gem fecal.	18
3.4. Determinação do NMP de estreptococos de origem fe- cal.	19
3.5. Concentração das amostras de água.	20
3.6. Pesquisa de bactérias do gênero Salmonella.	21
3.6.1. Inoculação de meios de enriquecimento e de isolamento.	21
3.6.2. Isolamento e identificação bioquímica.	22
3.6.3. Provas sorológicas.	24
3.7. Pesquisa de <u>C. perfringens</u> tipo A.	25
3.7.1. Semeadura inicial.	25
3.7.2. Isolamento de colônias suspeitas.	26
3.7.3. Identificação bioquímica das cepas isoladas	26
4. RESULTADOS.	29
5. DISCUSSÃO.	33
6. CONCLUSÕES.	49
7. ANEXO I.	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	61

1. INTRODUÇÃO.

1. INTRODUÇÃO

Um dos atos mais importantes na vida do homem é a alimentação, não só por causa da necessidade de se nutrir, mas também pelas conotações sociais que tem este ato.

Para que a alimentação preencha os requisitos mencionados, depreende-se que o alimento deve ser nutritivo, atrativo, limpo e livre de substâncias ou organismos que possam representar risco para a saúde do consumidor (HOBBS & GILBERT,⁴⁸ 1978). Entretanto, diversos são os modos de contaminação dos alimentos. O homem, os animais, os próprios alimentos, o ambiente, utensílios e equipamentos, bem como o processamento industrial podem, de uma forma ou de outra, veicular agentes contaminantes.

Epidemiologicamente, classificam-se as fontes de infecção em primárias e secundárias, sendo primárias aquelas responsáveis pela perpetuação da espécie do agente na natureza. Desta maneira, são fontes primárias o homem, os animais e o solo, sendo a água, o ar e os equipamentos utilizados no processamento, armazenamento e distribuição dos alimentos, assim como a própria planta física, com seus pisos, paredes, tetos , etc., fontes secundárias.

Apesar dos métodos sanitários modernos para produzir, manipular, preparar, cozinhar, distribuir e servir os alimentos, o número de casos de toxinfecções alimentares cresce a cada ano, em todo o mundo (BOWMER¹⁴, 1965).

O termo toxinfecção alimentar engloba as doenças ocasionadas diretamente pelo consumo de alimentos e que têm um período relativamente curto de incubação (THATCHER & CLARK¹⁰⁷, 1973). Quando aplicado às doenças produzidas por microrganismos, emprega-se num sentido muito amplo. Inclui doenças causadas pela ingestão de toxinas elaboradas pelo microrganismo ao se desenvolver nos alimentos, assim como aquelas outras resultantes da invasão, multiplicação no hospedeiro e alterações tissulares a ela devidas, produzidas por germes patogênicos transportados pelo alimento (THATCHER & CLARK¹⁰⁷, 1973), havendo multiplicação dos agentes neste.

Os sintomas iniciais destas doenças são aqueles indicativos de um processo gastrintestinal: dores abdominais,

diarréia ou mesmo síndrome disentérico acompanhado, frequentemente, de vômitos. Entretanto, podem aparecer outras manifestações no transcurso da doença tal como sucede no botulismo (THATCHER & CLARK¹⁰⁷, 1973).

Existe uma tendência generalizada para associar toxinfecção alimentar com deterioração do alimento, porém, em geral, estas doenças estão relacionadas com a ingestão de alimentos aparentemente normais.

De fato, o crescimento de agentes patogênicos a té alcançar níveis perigosos pode ter lugar muito antes que a alteração seja suficiente para alertar ao consumidor. Este período, desde o estabelecimento de uma condição de risco até que o grau de alteração do alimento seja suficiente para evitar o consumo do mesmo, é denominado "tempo de risco".

Para que se possa desenvolver um quadro de toxinfecção alimentar, é necessário um grande número de bactérias no alimento, sendo preciso, portanto, que a bactéria encontre condições para sua multiplicação neste.

De fato, existe uma série de fatores que influem no desenvolvimento bacteriano, sendo uns dependentes do próprio alimento (fatores intrínsecos) e outros, do meio (fatores extrínsecos). Entre os primeiramente mencionados estão o pH, o potencial de óxido-redução (Eh), os nutrientes e a quantidade de água disponível no alimento. Entre os extrínsecos são incluídos a temperatura, umidade relativa (UR) e a composição da atmosfera circundante (JAY⁵⁷, 1973; FRAZIER³⁴, 1976). Estes fatores se encontram inter-relacionados e podem inibir ou favorecer o desenvolvimento bacteriano dependendo das necessidades essenciais peculiares a cada organismo.

A temperatura é um dos fatores que mais afeta o crescimento dos microrganismos (LAWRIE⁶⁵, 1967; FRAZIER³⁴, 1976). Cada bactéria tem uma faixa ótima de temperatura, que é aquela em que seu crescimento é melhor. De acordo com esta temperatura, as bactérias são de forma geral classificadas em mesófilas, termófilas e psicrófilas.

Os microrganismos mesófilos têm sua temperatura ótima entre 30° C e 45° C, incluindo a maioria dos agentes patogênicos e dos deteriorantes de alimento; já os termófilos têm sua temperatura ótima entre 55° C e 65° C, sendo que alguns

- 66-LEE, J. A. et al. Salmonellas on pig farms and in abattoirs. J. Hyg., Cambridge, 70:141-150, 1972.
- 67-LEIFSON, E. The fermentation of sodium malonate as a means of differentiating Aerobacter and Escherichia. J. Bact., 26: 329-330, 1933.
- 68-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. São Paulo. São Paulo, 1979. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).
- 69-LIBELT, K. Bacterial contamination and pollution of the scalding water used in the slaughtering of pig. Med. Veteryn., 27:415-419, 1971.
- 70-LOPES, C. A. M. Contribuição ao estudo da flora bacteriana de sardinha (Sardinella aurita) e de pescada branca (Microdon ancylodon) São Paulo, 1972. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da USP).
- 71-MATCHES, J. R. & LISTON, J. Effects of incubation temperature on the salt tolerance of Salmonella. J. Milk Food Technol., 35:39-44, 1972.
- 72-McCLUNG, L. S. Human food poisoning due to growth of Clostridium perfringens (Welchii) in freshly cooked chickens preliminary note. J. Bact., 50:229-31, 1945.
- 73-McDONAGH, V. P. & SMITH, G. H. The significance of the abattoir in Salmonella infection in Bradford. J. Hyg., Cambridge, 56:271-279, 1958.
- 74-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Curitiba, Pr., Imprensa Salem, s.d.

a qual é importante para o crescimento da maioria dos microrganismos (ICMSF⁵⁵, 1980).

O pH das carnes pode variar de, aproximadamente, 7,0, ótimo para muitas bactérias patogênicas e deteriorantes, até níveis próximos de 5,0. O pH da carne é inversamente proporcional à quantidade de ácido lático produzido após a morte. Um pH de 7,0 corresponderia à quase ausência deste ácido, sendo que 5,5 corresponderia a, aproximadamente, 1% do mesmo. A quantidade de ácido lático depende, por conseguinte, da quantidade de glicogênio do músculo no momento da morte. Esta quantidade será baixa se o músculo for exercitado (ICMSF⁵⁵, 1980), razão pela qual é preconizado o descanso do animal antes do abate.

Por outra parte, com exceção da superfície externa e o trato gastrintestinal e respiratório, os tecidos de animais sadios contêm poucos microrganismos. Existem no organismo são, efetivos mecanismos de defesa que controlam os agentes infecciosos. Entretanto, estas defesas podem vir a falhar após o abate e as bactérias presentes no trato intestinal podem invadir a corrente sanguínea, alcançando a intimidade do músculo (ICMSF⁵⁵ 1980).

Em geral, pode-se considerar as bactérias presentes na carne como provenientes de duas fontes: uma, chamada contaminação endógena, é proveniente do próprio animal; a outra, denominada exógena, proveniente do meio em que se desenvolvem as operações de abate e todo o processamento posterior da carne (THATCHER & CLARK¹⁰⁷, 1973).

A incidência de toxinfecções alimentares veiculadas por produtos cárneos alcançou, na Alemanha, uma taxa de 47% do total de casos registrados no período de 1949-1959 e de 71%, no de 1960 a 1970 (WATSON¹⁰⁹, 1975).

Por outro lado, registros oficiais indicam que os agentes de toxinfecções alimentares mais frequentemente veiculados pelas carnes são as salmonelas, o C. perfringens e o Staphylococcus aureus.

As salmonelas têm como habitat natural o trato intestinal do homem e dos animais (FRAZIER³⁴, 1976). Por conseguinte, o homem, os animais e seu meio são as fontes principais de salmonelas (BANWART⁹, 1980).

Todos os membros do gênero são potencialmente patogênicos para o homem e os animais vertebrados. A doença causada por estas bactérias pode ser dividida em dois grandes grupos, considerando os sintomas clínicos, forma de propagação e patogenicidade: o primeiro grupo compreende as febres tifóide e paratifóides, causadas pelas S. typhi e S. paratyphi A, B e C, que afetam o homem e o chimpanzé e se transmitem pela água e alimentos, bem como por contato direto. O quadro clínico é caracterizado predominantemente por septicemia havendo, porém, manifestações gastrintestinais; o segundo grupo corresponde às gastroen-terites, comumente chamadas salmoneloses (ICMSF⁵⁵, 1978). Estas salmoneloses são causadas por uma grande variedade de sorotipos de salmonelas, as quais não estão especificamente adaptadas a um hospedeiro determinado e que podem se transmitir ao homem a partir de uma grande variedade de fontes. Entre elas, as que têm um papel preponderante são os alimentos contaminados já durante sua produção ou durante seu armazenamento ou, ainda, na manipu-lação posterior (BECERRIL e cols.¹¹, 1979).

Esta forma de transmissão de salmonelas, através da ingestão de alimento contaminado, é a que assume maior impor-tância (PROST & RIEMANN⁸⁹, 1967.).

Estudos epidemiológicos realizados em diversos pa-íses têm evidenciado serem as salmonelas um dos agentes patogê-nicos mais prevalentes tanto em casos isolados como em surtos de toxinfecção alimentar (PROST & RIEMANN⁸⁹, 1967; TAYLOR & MCCOY¹⁰⁶, 1969; TODD¹⁰⁸, 1978).

Levantamentos efetuados nos Estados Unidos da A-mérica do Norte estimam entre 400.000 a 2.000.000 o número de casos anuais destas doenças (TODD¹⁰⁸, 1978).

Devido a sua incidência universal, as suas múlti-plas manifestações e a sua complexa epidemiologia, a salmonelo-se hoje constitui uma séria ameaça à saúde do homem e dos ani-mais.

Apesar dos esforços empreendidos na vigilância e pidemiológica, as incidências apresentadas seguramente represen-tam uma estimativa "por baixo" da situação real, principalmente em regiões onde a notificação é precária, pois estima-se que so-mente de 1 a 10% do total de casos é notificado (BANWART⁹, 1980).

O "CENTER FOR DISEASE CONTROL"²⁰ (1976) estabele-

ce que 21,2% dos surtos e 32,7% dos casos isolados de intoxicação alimentar registrados em 1976 nos Estados Unidos foram devidos à salmonela, ocupando o primeiro lugar entre os agentes etiológicos causadores desta síndrome. O aumento do número de casos tem sido atribuído a melhores condições de diagnóstico, aprimoramento das técnicas laboratoriais e à facilidade de registros. Entretanto nas áreas onde o diagnóstico e registro têm sido sempre adequados, é também notório o aumento de surtos desta doença (BANWART⁹, 1980).

As primeiras manifestações da doença ocorrem, usualmente, entre 6 e 36 horas após a ingestão do alimento, podendo ser maior o período de incubação (HOBBS & GILBERT⁴⁸, 1978). Os sintomas são caracterizados por febre, dor abdominal, diarreia, vômitos e dor de cabeça (PROST & RIEMANN⁸⁹, 1967; HOBBS & GILBERT⁴⁸, 1978). Em geral, a doença é de curta duração, havendo recuperação entre 1 e 7 dias. A evolução é, frequentemente, benigna, embora existam registros de casos fatais, especialmente em crianças, anciãos e em pessoas debilitadas (HOBBS & GILBERT⁴⁸, 1978).

O mecanismo pelo qual as salmonelas causam gastroenterite não está ainda completamente elucidado. Embora alguns autores considerem que na patogenicidade desta bactéria estariam envolvidos mais de um sistema, existindo uma ação combinada da célula bacteriana e uma endotoxina (PROST & RIEMANN⁸⁹, 1967), outros consideram este tipo de toxinfecção como resultado de uma infecção (HOBBS & GILBERT⁴⁸, 1978; JENNINGS⁵⁸, 1975). Entretanto todos os autores concordam que é necessária a ingestão de um alto número de salmonelas para que a toxinfecção possa desenvolver-se.

Por outro lado, a dose mínima infectante, capaz de produzir a doença, varia dependendo da suscetibilidade do consumidor, da virulência do sorotipo ou da cepa envolvida (BANWART⁹, 1980), ou de ambos.

Adultos sadios podem ingerir 10^5 a 10^7 células por grama de alimento, sem que apareçam sintomas da doença. Entretanto estudos sobre a transmissão entre pacientes hospitalizados indicaram que uma dose bem inferior foi capaz de desencadear a doença. As crianças, os idosos, os desnutridos e pessoas que sofrem de doenças debilitantes são mais suscetíveis à infecção por salmonelas do que adultos jovens sadios (BANWART⁹, 1980).

Para atingir o número suficiente para produzir toxinfecção alimentar, a bactéria, após ter contaminado o alimento, necessita encontrar nele condições favoráveis a seu desenvolvimento. Já vimos que todos os alimentos são bons meios de cultura por sua riqueza em nutrientes, sendo a carne o melhor de todos. Entretanto, além do substrato em que se encontram, outros fatores são necessários para o desenvolvimento bacteriano, dos quais a temperatura é fundamental.

As salmonelas são consideradas microrganismos mesófilos, tendo um ótimo crescimento em temperaturas de 35° - 37° C, mas podem multiplicar-se numa faixa de temperatura entre 5° e 47° C (BANWART⁹, 1980). A temperatura mínima de crescimento varia, estando relacionada com outros fatores de crescimento, dentre os quais se destaca o tipo de alimento (ANGELOTTI e cols.⁶, 1961).

Em geral, a maior parte das salmonelas são destruídas à temperatura de 55° C por 1 hora ou a 66° C durante 15 a 20 minutos (BOWMER¹⁴, 1965).

Outro parâmetro a ser considerado, também de grande importância na sobrevivência e crescimento bacteriano, é o pH. Em geral, as salmonelas crescem melhor em alimentos que não sejam ácidos, sendo que seu pH ótimo está na faixa de 6,5 a 7,5. A faixa de pH mais baixa registrada em que houve crescimento de salmonelas foi a de 4,0 a 5,5 (BANWART⁹, 1980). PROST & RIEMANN⁸⁹ (1967), afirmam que valores de pH acima de 9,0 tem efeito bactericida.

O grau de umidade do alimento também tem grande influência no desenvolvimento de salmonelas. Considera-se que a atividade aquosa (Aa) mínima para o crescimento desta bactéria seria da ordem de 0,93 a 0,96 (BANWART⁹, 1980), dependendo esta variação do tipo de alimento (FRAZIER³⁴, 1976).

Em relação com a concentração de sal necessária para inibir o crescimento, ALFORD & PALUMBO¹ (1969), são de opinião que isto dependeria da temperatura e de outros fatores. Estes autores obtiveram o crescimento desta bactéria em concentrações de 3,5% de sal em carne de suíno com pH de 5,0 e temperatura de 10° C. Mas, nestas mesmas condições de temperatura e pH, houve inibição de crescimento por concentrações de 5% de sal; já em temperaturas de 20° C a 30° C, obtiveram desenvolvimento com esta concentração. Também em carne suína com pH de 6,5 e tempe-

ratura de 20° C e 30° C obtiveram crescimento de salmonelas em concentrações de 8% de sal.

MATCHES & LISTON⁷¹ (1972), observaram que concentrações baixas de cloreto de sódio têm uma ação estimulante na multiplicação das salmonelas.

As salmonelas apresentam grande ubiquidade, tendo sido reveladas em matérias-primas e alimentos processados de origem animal e vegetal (PROST & RIEMANN⁸⁹, 1967; TODD¹⁰⁸, 1978) e também em águas poluídas utilizadas na irrigação de hortaliças, assim como para fins recreativos (GELDRICH & VAN DONSEL⁴⁰, 1970; GELDREICH & BORDNER³⁹, 1971). Os produtos de origem animal são reconhecidamente importantes fontes de salmonelose para o homem (WATSON¹⁰⁹, 1975). Há mais de 80 anos têm sido realizadas investigações que demonstram que entre os produtos de origem animal, a carne contaminada é importante veículo de transmissão de salmonelas (TODD¹⁰⁸, 1978). Dentre as várias espécies animais, criadas especificamente para servirem como fonte protéica na alimentação humana, destacam-se os suínos como um dos principais reservatórios de microrganismos do gênero Salmonella, atribuindo-se aos alimentos desta proveniência um papel muito importante como veículo na disseminação e manutenção do agente etiológico na população humana (COSTA e cols.²⁵, 1972).

Em 1936 HORMAECHE & SALSAMENDI⁵³, no Uruguai, realizaram um trabalho pioneiro, isolando salmonelas de nódulos linfáticos de suínos aparentemente sadios abatidos para consumo da população. Este trabalho evidencia claramente o papel desempenhado por estes animais na transmissão de salmonelas ao homem.

A partir deste trabalho, foram desenvolvidas muitas pesquisas em diversos países, demonstrando a presença desta bactéria em gânglios e fezes de suínos destacando-se, entre outras, as de SCOTT⁹⁴ (1940) na Inglaterra; RUBIN e cols.⁹² (1942) e GALTON e cols.³⁶ (1954) nos Estados Unidos; McDONAGH & SMITH⁷³ (1958) e GALBRAITH³⁵ (1961) na Inglaterra; KAMPELMACHER e cols.⁶⁰ (1963) na Holanda; LEE e cols.⁶⁶ (1972) na Inglaterra; KATSUBE⁶² no Japão e SINGH & KAURA⁹⁹ (1976) na Índia.

No Brasil, PESTANA & RUGAI⁸⁷ (1943), isolaram salmonelas de gânglios linfáticos mesentéricos e NEIVA⁷⁹ (1946), obteve resultados positivos para a presença desta bactéria em gânglios mesentéricos e fezes de suínos.

De grande importância em Saúde Pública são os trabalhos de COSTA e cols.²⁵ (1972), realizado num matadouro de suínos de Salvador, Bahia. Nesta pesquisa foi verificada a presença de salmonelas em gânglios linfáticos pré-crurais e pré-escapulares de suínos aparentemente saudáveis, abatidos para consumo da população. Resultados semelhantes foram obtidos por ZEBRAL e cols.¹¹⁴ (1974), no Matadouro Santa Cruz, na Cidade do Rio de Janeiro e por NEIVA e cols.⁸⁰ (1977), em Curitiba.

Uma pequena proporção de suínos é portadora de salmonela já nos locais de criação, mas quando estes animais infectados são mantidos com suínos saudáveis durante o transporte, no local de venda, ou nos currais dos abatedouros, as salmonelas são, rapidamente, disseminadas de animal para animal diretamente por contaminação fecal ou indiretamente, através da contaminação do ambiente. A extensão desta contaminação nos currais do abatedouro depende das condições do local, do número de animais que chega ao matadouro, muitas vezes, excedendo a capacidade de abate e do período de tempo que os animais são mantidos em confinamento.

Sob estas condições, haveria um real perigo de disseminação da infecção, podendo alcançar a carcaça e, consequentemente, a carne distribuída estará contaminada com salmonela (McDONAGH & SMITH⁷³, 1958).

BOWMER¹⁴ (1965), na Irlanda, evidenciou a contaminação de carcaças de suínos numa proporção de 3% das estudadas; entretanto, examinando linguiças preparadas com carne suína, encontrou 70% das mesmas contaminadas com esta bactéria.

A ocorrência de salmonelas em carnes congeladas tem sido de grande interesse no comércio internacional. Por exemplo, TAYLOR & McCOY¹⁰⁶ (1969), examinando amostras de carnes congeladas importadas pela Inglaterra constataram, no período de 1956/59, a presença de salmonelas em 4% das mesmas, sendo que tal positividade se elevou a 16% no período 1961/63. Destas carnes, as procedentes de Nova Zelândia e da América do Sul foram as que se revelaram com maior grau de contaminação.

HOBBS & GILBERT⁴⁹ (1970), também na Inglaterra, examinando amostras de carne de equino proveniente do Brasil, constataram em 19% da mesma a presença de salmonelas.

MOSSEL e cols.⁷⁶ (1972), realizaram estudo em

115 amostras de carne desossada congelada, comprada pelos Países Baixos, proveniente da América do Sul em 1968-1971, encontrando positividade para salmonelas em 16 (15%).

No Brasil, ASSUMPÇÃO⁷ (1946), examinando amostras de carne bovina e suína coletadas no Município de São Paulo, comprovou que 15% delas se revelavam contaminadas por salmonelas. Este autor constatou também que a frequência de isolamentos de salmonelas foi maior na carne suína (19%) do que na bovina (10%).

LEITÃO⁶⁸ (1979), verificou que em alimentos não processados a positividade para salmonela era de 6,5%, elevando-se a 19,3% em produtos processados.

É importante salientar que a ocorrência de salmonelas em alimentos de origem animal, parcial ou totalmente industrializados, é bastante elevada, particularmente em carnes moídas e embutidos.

PAULA⁸² (1976), examinando 200 amostras de carne moída vendida no Rio de Janeiro, constatou que 28 (14%) mostravam-se positivas para salmonelas. Por sua vez, SANDRI⁹³ (1976), em Porto Alegre, examinou embutidos de carne bovina e de galinha, constatando que das 108 amostras analisadas, 35 (32,4%) eram positivas para salmonela.

IARIA e cols.⁵⁴ (1965), analisaram 19 amostras de quibe cru vendido na Cidade de São Paulo e constataram em 1 (5,2%) a presença de Salmonella Schottmüller.

BARUFALDI e cols.¹⁰ (1979), estudaram 36 amostras de carne moída vendida em São Paulo e de 20 (55%) isolaram cepas de bactérias do gênero Salmonella.

CERQUEIRA-CAMPOS²¹ (1980), estudou, também, amostras de carne moída e verificou que 7 (14%) das mesmas mostravam-se contaminadas por salmonelas.

Com relação ao C. perfringens, desde 1892, esta bactéria é considerada como um agente patogênico para o homem e os animais. Mas, é a partir dos estudos de McCLUNG⁷² (1945), nos Estados Unidos, que começa a se considerar esta bactéria como agente de toxinfecção alimentar. A partir deste trabalho, começam a ser investigados e publicados surtos produzidos por esta bactéria em diversas partes do mundo, principalmente na Inglaterra. HOBBS e cols.⁵⁰ (1953), publicaram um trabalho pormenoriza-

do no qual ficou confirmado o papel desta bactéria como agente de toxinfecção alimentar.

Entretanto nos Estados Unidos a importância do C. perfringens em Saúde Pública somente foi totalmente aceita a partir de 1960. Atualmente esta bactéria é considerada como um dos agentes produtores de toxinfecções alimentares mais frequentes, sendo que em alguns países ocupa o segundo lugar (GENIGEORGIS⁴¹, 1975).

O C. perfringens é uma bactéria que se encontra amplamente distribuída na natureza e tem sido isolada do solo, ar, água, esgotos, fezes humanas e animais e muitos alimentos (YAMAGISHI e cols.¹¹¹, 1964; BRANT e cols. (A e B)¹⁵ e ¹⁶, (1978). É um bacilo Gram-positivo, imóvel, formador de esporos. Sendo uma bactéria anaeróbica, não requer condições estritas de anaerobiose. Sua possibilidade de crescimento inicial depende do potencial de óxido-redução do meio. O ótimo é aproximadamente -200 mv, dependendo da cepa, pH, inóculo inicial e do estado metabólico da célula.

Culturas muito ativas não são inibidas pelo oxigênio atmosférico, o que permite que cresçam em alimentos que não apresentem anaerobiose apreciável (GENIGEORGIS⁴¹, 1975).

O C. perfringens cresce em pH entre 5,0 e 9,0, tendo um ótimo a 7,0. As células de culturas jovens são destruídas pelo suco gástrico mas as células que alcançaram a fase final da curva de crescimento são mais ácido-resistentes (GENIGEORGIS⁴¹, 1975). Esta característica é de grande importância devido ao fato de que, ao contrário da enterotoxina Staphylococcus aureus e da neurotoxina do C. botulinum, que se encontram presentes no alimento responsável pela toxinfecção alimentar, a enterotoxina do C. perfringens não é normalmente formada no alimento. Ela é produzida durante a esporulação das células vegetativas ao nível do intestino delgado. Quando se produz a lise do esporângio, a enterotoxina é liberada na luz do intestino (HAUSCHILD⁴⁵, 1971; HAUSCHILD⁴⁶, 1973).

As toxinas produzidas pelo C. perfringens foram revistas por HAUSCHILD⁴⁵, em 1971. Há 4 toxinas principais (alfa, beta, epsilon e iota). Relacionadas com a produção destas toxinas, as cepas de C. perfringens são divididas em 5 grupos: A, B, C, D e E. O tipo A - produtor de alfa-toxina - é considerado o agente etiológico de toxinfecções alimentares, sendo que ce-

pas do tipo C também têm sido envolvidas em gastroenterites graves na Alemanha (BANWART⁹, 1980).

A capacidade desta bactéria de sobreviver ao cozimento e multiplicar-se nos alimentos durante o resfriamento e armazenamento é um importante fator na epidemiologia dessa toxinfecção alimentar (SUTTON¹⁰³, 1966).

Com relação à temperatura de desenvolvimento desta bactéria, são divergentes as opiniões dos diferentes autores. Segundo JAY⁵⁷ (1973), as temperaturas entre 37° C e 43° C permitem sua multiplicação; para FRAZIER³⁴ (1976), são as temperaturas entre 43° C e 47° C as ótimas para sua multiplicação. BANWART⁹ (1980), considera que a temperatura ótima está entre 37° C e 47° C e que o C. perfringens cresce a 15° C e a 52° C.

As cepas de C. perfringens observadas em 1953 por HOBBS e cols.⁵⁰ têm como característica a formação de esporos termorresistentes, os quais podem sobreviver a temperaturas de 100° C por uma hora, e que podem ou não produzir halo de hemólise em ágar-sangue.

De sua parte, HALL e cols.⁴⁴ (1963), comparando as características das cepas implicadas em surtos de toxinfecção alimentar nos Estados Unidos com aquelas isoladas de incidentes similares na Inglaterra e outros países, concluiu que 75% das cepas dos Estados Unidos eram termossensíveis e que todas as da Inglaterra eram termorresistentes.

Em 1968 SUTTON & HOBBS¹⁰⁴ relatam o isolamento de cepas termossensíveis implicadas em surtos de toxinfecção alimentar na Inglaterra. A partir deste trabalho, aceita-se que as cepas de C. perfringens que podem causar toxinfecção alimentar não estão restritas a grupos termorresistentes.

O número exato de C. perfringens necessário para causar a doença de origem alimentar ainda é controverso mas admite-se que a presença de 10^6 a 10^8 células por grama de alimento constitui um risco para a saúde do consumidor (BANWART⁹, 1980).

A temperatura de cocção destrói as células vegetativas do C. perfringens porém ativa os esporos, propiciando a sua germinação e multiplicação. A doença é caracterizada por um período de incubação de 8 a 24 horas, sendo os principais sintomas: diarreia, dores abdominais, algumas vezes acompanhados por

náuseas e vômitos, ocorrendo, raramente, febre e cefaléia (GENIGEORGIS⁴¹, 1975). Estes sintomas desaparecem espontaneamente, em geral, 12 e 48 horas após o início da doença (HOBBS & GILBERT⁴⁸, 1978). Pode, entretanto, haver casos fatais, principalmente entre pessoas idosas ou muito debilitadas (HOBBS⁴⁷, 1965; FRAZIER³⁴, 1976; BANWART⁹, 1980).

A partir dos trabalhos de McCLUNG⁷² (1945) e de HOBBS e cols.⁵⁰ (1953), nos Estados Unidos e na Inglaterra respectivamente, têm sido registrados numerosos relatos de surtos de toxinfecção alimentar por C. perfringens.

TODD¹⁰⁸ (1978), realiza uma revisão, comparando os surtos ocorridos em 6 países que incluíam Canadá, Estados Unidos, Inglaterra, País de Gales, Japão e Austrália. Segundo os dados deste autor, o C. perfringens ocupa o terceiro lugar como agente de toxinfecção alimentar nos dois primeiros países mencionados sendo que, na Inglaterra e País de Gales, constitui o segundo agente mais importante e o predominante, na Austrália, no período de 1967 e 1971.

É sabido que somente uma pequena fração do total de surtos envolvendo este organismo é registrada. De fato, o número de surtos e casos produzidos por esta bactéria não são bem conhecidos. A sintomatologia moderada e a curta duração da doença, que torna, usualmente, desnecessário o atendimento médico, faz com que a maior parte dos surtos registrados sejam os devidos a alimentos consumidos em estabelecimentos comerciais onde existem muitas pessoas envolvidas, ficando os casos isolados sem registro.

Os alimentos envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar causada pelo C. perfringens são principalmente carnes bovinas, suínas e de aves cozidas ou assadas, preparadas em peças ou em forma de tortas resfriadas lentamente e, em geral, ingeridas no dia seguinte a sua preparação e frequentemente armazenadas sem refrigeração (HOBBS e cols.⁵⁰, 1953; SUTTON & HOBBS¹⁰⁴, 1968; DUNCAN²⁸, 1970; CENTER FOR DISEASE CONTROL¹⁸, 1978; TODD¹⁰⁸, 1978). Entretanto, outros alimentos, como o peixe, também foram associados a estes surtos (CENTER FOR DISEASE CONTROL¹⁸, 1978).

De fato, a alta prevalência de C. perfringens, tanto termorresistentes quanto termossensíveis, em alimentos, es

pecialmente em carnes frescas e resfriadas, tem sido demonstrada por vários autores em diferentes países (HOBBS & GILBERT⁴⁸, 1968; ANGELOTTI e cols.⁵, 1962; STRONG e cols.¹⁰¹, 1963; HALL & ANGELOTTI⁴³, 1965; YASUKAWA¹¹³, 1978).

No Brasil, também foram realizadas pesquisas a respeito. LOPES⁷⁰ (1972) isolou esse microrganismo de sardinhas vendidas em São Paulo. Em Campinas, SERRANO⁹⁵ (1976), constatou a presença de C. perfringens em carnes bovinas e suínas, língua fresca, salsicha, frango, peixe e coxinhas de galinha. ROBBS & ROBBS⁹⁰ (1979) no Rio de Janeiro verificam a presença desta bactéria em língua. Em São Paulo, CERQUEIRA-CAMPOS²¹ (1980), isolou C. perfringens de carne moída vendida no varejo.

Dos alimentos que são de origem animal, a carne constitui uma das fontes de proteína mais apreciadas pelo homem e também tem demonstrado ser um dos principais veículos de microrganismos produtores de toxinfecção alimentar.

A influência que as práticas de higiene desenvolvidas durante o abate tem sobre as condições microbiológicas encontradas nas carnes, foi tema de estudos aprimorados, no mundo inteiro.

É consenso geral que a obtenção de uma carne higiênica depende, em última instância, de dois fatores fundamentais: em primeiro lugar, do estado sanitário do animal e, em segundo, do ambiente que o cerca em todos os momentos do preparo da carcaça.

ROBERTS⁹¹ (1980), estabelece que o problema fundamental de higiene no abatedouro é a remoção dos pelos e do trato intestinal dos animais, evitando seu contato com a carcaça. Entretanto as técnicas para remover os pelos variam nas diferentes espécies abatidas para consumo. No suíno, a retirada dos pelos é realizada em duas etapas. Primeiramente, a carcaça do animal é submetida a escaldamento, que tem como finalidade afrouxar os pelos e preparar a pele para o próximo passo, que é a depilação.

Existem diferentes técnicas de escaldamento mas, a mais antiga e mais usada, é a do chamado "tanque de escaldamento". Este sistema tem recebido muitas críticas por parte dos higienistas como, por exemplo, a de que o tempo e a temperatura não são suficientes para destruir o grande número de bactérias

- principalmente as de origem entérica - que aumentam, progressivamente, na água durante o processo de escaldamento (SNIJDER¹⁰⁰, 1975; ROBERTS⁹¹, 1980). Também é objeção generalizada que esta água carregada de bactérias penetraria através da boca e do ferimento de sangria, alcançando os pulmões e a intimidade dos tecidos (ROBERTS⁸⁰, 1980).

Muitos trabalhos têm sido publicados demonstrando a contaminação apresentada por essas águas (DELICHEV & SAVOV²⁶, 1968; DOCKERTY e cols.²⁷, 1970; LIBELT⁶⁹, 1971; PROST & LIBELT⁸⁸, 1972; AMEMEYA & NAKASHIMA², 1974; PANETTA e cols.⁸¹, 1977).

O grau de contaminação observado por estes autores é variável, mas comprova que será tanto maior quanto maior for o número de animais processados.

Por outro lado, esses pesquisadores estabelecem a necessidade de se proceder à troca periódica da água de escaldamento, a fim de se impedir que a mesma se transforme em uma grave fonte de contaminação da carne, principalmente por bactérias de origem entérica.

Já em 1914, o Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos da América do Norte recomendava a pesquisa de bactérias do grupo coliforme como indicadoras das condições sanitárias das águas, para constatação da presença de poluição de origem fecal. Mais tarde, devido às limitações do valor sanitário da pesquisa deste grupo de bactérias, surgiu a proposta da utilização dos denominados "coliformes fecais". Estas bactérias, quando presentes, ofereceriam uma maior segurança com relação ao estabelecimento da origem fecal da poluição das águas (GELDREICH³⁸, 1978).

A constatação da existência de poluição de origem fecal indica o risco da presença de outros organismos entéricos patogênicos, tais como Salmonella sp., Shigella sp. e vírus da hepatite infecciosa (CHRISTÓVÃO²⁴, 1974).

Em trabalho por nós realizado, estudaram-se as condições da água de escaldamento quanto à presença de bactérias indicadoras de poluição fecal. Neste estudo, comprovou-se a presença destes microrganismos, procurando-se relacionar os resultados obtidos com a possível presença de bactérias patogênicas de origem intestinal, tais como salmonelas e C. perfringens (SILVA CAMPS⁹⁷, 1980).

Nesse trabalho também foram registradas as temperaturas das amostras de água, assim como o pH, ambos os fatores de grande importância na limitação da sobrevivência ou não das bactérias; diante dos valores encontrados e considerando-se a pesquisa de BOWMER¹⁴ (1965), seria possível a sobrevivência destes microrganismos na água de escaldamento estudada.

Outras bactérias de origem fecal, como as pertencentes ao gênero Streptococcus, têm sido, também, investigadas como possíveis indicadoras de poluição fecal das águas. De modo geral, os estreptococos fecais apresentam grande resistência às condições adversas do ambiente. Isto fez com que estas bactérias fossem também pesquisadas em alimentos em que o processamento ou o método de conservação compromete a sobrevivência de outros indicadores mais sensíveis (THATCHER & CLARK¹⁰⁷, 1973).

No estudo que realizamos (SILVA CAMPS⁹⁷, 1980), dado que as águas de escaldamento tinham temperaturas entre 59°C e 63°C, além da determinação do NMP/100 ml de coliformes totais e fecais, foi, também, realizada a verificação do NMP de estreptococos fecais. Verificamos que nestas águas, os estreptococos fecais podem constituir-se em melhores indicadores de poluição fecal do que os coliformes.

No Brasil, o método depilatório mais comumente empregado inclui o uso do tanque de escaldamento. Sabemos que a água deste tanque está sistematicamente contaminada com bactérias originárias do trato gastrointestinal dos animais, o que sugere, enfaticamente, a possibilidade de contaminação com bactérias patogênicas, também de origem fecal, causadoras de toxinfecções alimentares.

Estes fatos induziram-nos a planejar e desenvolver a presente investigação.

2. OBJETIVOS.

Com base no exposto na introdução e tendo em vista a carência, em nosso meio, de investigações sobre as condições microbiológicas da água no escaldamento de suínos em matadouros, planejou-se esta investigação, a fim de se atingir os seguintes objetivos:

1 - Verificar em matadouros de suínos, as condições sanitárias da água utilizada na operação de escaldamento, através da determinação do Número Mais Provável (NMP) de bactérias coliformes fecais e estreptococos fecais.

2 - Verificar nas amostras de água analisadas a positividade para bactérias do gênero Salmonella e Clostridium perfringens.

3 - Demonstrar que o tanque de escaldamento representa um ponto crítico na linha de produção de carne suína, por manterem-se nele viáveis agentes patogênicos, como Salmonella e C. perfringens.

4 - Fornecer subsídios para futuras regulamentações do uso do tanque de escaldamento em matadouros de suínos, em nosso meio.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PROCEDÊNCIA DA AMOSTRA

Foram estudadas 50 amostras de água utilizada no escaldamento de suínos durante o processo de abate, coletadas em um matadouro localizado na Grande São Paulo, no município de Carapicuíba.

3.2. COLHEITA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

As amostras a serem examinadas eram colhidas no momento em que se completava o escaldamento de 200 suínos.

Cada amostra, de aproximadamente 1.100 ml, era obtida imergindo-se a uma profundidade de 30 cm, no tanque, um frasco de vidro esterilizado com tampa esmerilhada e preso a um cordel estéril.

As amostras, devidamente identificadas, eram transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas (Isopor) contendo sacos plásticos com gelo e aí mantidas até serem examinadas.

Após a obtenção da amostra, procedia-se ao registro da temperatura da água do tanque e, no laboratório, a medida do pH.

3.3. DETERMINAÇÃO DO NMP DE BACTÉRIAS COLIFORMES DE ORIGEM FECAL

Esta determinação era realizada pelo método dos tubos múltiplos de fermentação, segundo a técnica recomendada pela AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION³ (1975).

A amostra de água a ser analisada era diluída de 10^{-1} a 10^{-5} , empregando-se como diluente, água tamponada estéril.

Em uma série de 3 tubos contendo caldo lauril-sulfato-triptose em concentração simples, com tubo de Durham, inoculava-se, em cada um deles, com os devidos cuidados de assepsia, 1 ml de água não diluída, procedendo-se da mesma forma com as diferentes diluições da amostra. Paralelamente

lamente eram também inoculados, com 10 ml de água não diluída, três tubos contendo caldo lauril-triptose em concentração dupla, com tubo de Durham.

Após a inoculação, os tubos eram incubados em estufa à temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Decorridas as primeiras 24 horas ± 2 horas, realizou-se a primeira leitura, sendo considerados presuntivamente positivos para coliformes os tubos que se revelavam com a presença de gás no tubo invertido de Durham.

Os tubos com prova negativa após 24 horas, eram incubados por mais 24 horas, à mesma temperatura. Decorrido este tempo, havendo produção de gás, a prova presuntiva era também considerada positiva. Porém, ocorrendo a ausência de produção de gás, a prova era considerada negativa para as respectivas porções de água inoculada.

A partir dos tubos de caldo lauril-sulfato-triptose apresentando produção de gás na prova presuntiva para coliformes, eram semeados tubos respectivos, contendo caldo EC (DIFCO) com tubo de Durham, os quais eram a seguir incubados em banho-maria a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas ± 2 horas.

Consideravam-se como positivos para a presença de bactérias coliformes de origem fecal, os tubos que se revelavam com produção de gás.

A partir das porções positivas, era calculado o NMP de coliformes de origem fecal por 100 ml de amostra, empregando-se para tal a tabela de Hoskins (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION³ (1975)).

3.4. DETERMINAÇÃO DO NMP DE ESTREPTOCOCOS DE ORIGEM FECAL

Esta análise era realizada empregando-se a técnica dos tubos múltiplos, recomendada pela AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION³ (1975).

Prova presuntiva - nesta prova, para cada amostra, em uma série de 3 tubos com caldo glicose-azida, era realizada a inoculação de 1 ml da

amostra da água não diluída em cada um. Em seguida, o mesmo era feito relativamente a cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-5}) da amostra. Paralelamente, 3 tubos contendo o mesmo meio com concentração dupla eram inoculados com 10 ml de água não diluída. Os tubos, assim inoculados, eram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas. A prova presuntiva era considerada positiva para estreptococos fecais quando, dentro desse período de incubação, observava-se turvação nítida do caldo semeado.

Prova confirmatória - a partir dos tubos com prova presuntiva positiva, eram semeadas 3 alçadas (alças com cerca de 3 mm de diâmetro) da cultura, em tubos respectivos contendo caldo e til-violeta-azida, os quais eram a seguir, incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Decorridas as primeiras 24 horas de incubação, procedia-se à leitura da prova, sendo a mesma considerada positiva quando ocorria turvação e formação de um de pósito de cor púrpura.

Os tubos negativos eram reinoculados e incubados por 24 horas, a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Se após este período de incubação o tubo se apresentasse com o aspecto acima descrito, a prova era considerada positiva; caso contrário, era tida como negativa para a respectiva porção de água.

A partir do número de porções positivas e empregando-se a tabela de Hoskins (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION,³ 1975), era calcu lado o NMP de estreptococos fecais por 100 ml da amostra examinada.

3.5. CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

Cada amostra era dividida em duas porções de cerca de 500 ml cada uma, sendo uma delas colocada em um becker de 1.000 ml, e concentrada, empregando-se o método

de floculação pelo hidróxido de alumínio (ENGLAND,³⁰ 1972) . Para tal, após agitação, eram tomados 15 ml de uma suspensão de estoque de hidróxido de alumínio seguida da centrifugação por 15 minutos a 2.000 rpm. Após a centrifugação , o sobrenadante era descartado e o precipitado, ressuspenso em solução salina 0,15M, até completar o volume de 15 ml. Essa suspensão, assim preparada, era a seguir adicionada lentamente à amostra, sendo a mistura mantida sob agitação em um agitador magnético, durante a operação. Após a adição do hidróxido de alumínio, a mistura era agitada por mais 30 minutos. Após a agitação, a mistura era mantida em repouso por 2 horas e durante este tempo produzia-se a floculação, evidenciada pela presença de um depósito no fundo do becker. O líquido sobrenadante era retirado e desprezado, sendo o sedimento, com aproximadamente 50 ml de volume, empregado na pesquisa de bactérias do gênero Salmonella.

A outra porção de aproximadamente 500 ml da amostra era centrifugada a 2.000 rpm, durante 20 minutos (HOFER & COSTA,⁵² 1972). A seguir, o sobrenadante era desprezado e o sedimento, empregado na pesquisa de Salmonellas e C. perfringens.

3.6. PESQUISA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO SALMONELLA

3.6.1. Inoculação de meios de enriquecimento e de isolamento.

Para cada amostra de água, os sedimentos obtidos nos dois sistemas de concentração eram divididos em duas porções, sendo cada uma semeada em frascos contendo respectivamente 100 ml de caldo selenito-novobiocina (PESSOA & PEIXOTO,⁸⁵ 1971) e 100 ml de meio Rappaport com a primeira modificação proposta por HOFER,⁵¹ (1972).

Em seguida, os frascos com caldo selenito-novobiocina inoculados eram incubados em banho-maria a 42,5^o C durante 24, 48 e 120 horas, e os contendo meio de Rappaport, eram mantidos em estufa a 37^o C durante 24 e 48 horas.

Após cada estágio de incubação, a partir dos meios de enriquecimento, eram semeadas placas contendo os seguintes meios: Ágar Verde Brilhante, Ágar Xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e Ágar Sulfito de Bismuto, as quais, a seguir, eram incubadas a 37° C durante 24 horas. Após a incubação de cada placa, eram selecionadas até 5 colônias suspeitas de serem de salmonelas, de acordo com as seguintes características:

Em Ágar Verde Brilhante - colônias incolores circundadas por um halo róseo a vermelho; em Ágar Xilose-lisina-desoxicolato - colônias vermelhas com ou sem centro negro; em Ágar Sulfito de Bismuto - colônias negras, verde escuras ou claras, com ou sem brilho metálico.

3.6.2. Isolamento e Identificação Bioquímica (ICMSF,⁵⁶ 1978).

Com o auxílio de uma agulha reta de níquel-cromo, as colônias selecionadas eram isoladas e inoculadas em tubos de ágar-tríplice-açúcar-ferro (ágar TSI), através de uma picada profunda na parte inferior (base) seguida de uma estria na parte superior (ápice ou superfície). Os tubos inoculados eram incubados a 35° C durante 24 horas, após o que se procedia à leitura, considerando-se como sugestivas para bactérias do gênero Salmonella as seguintes reações: ápice: de cor vermelha, revelando reação alcalina e mostrando a não utilização da lactose e sacarose; base: de cor amarela, pela reação ácida devida à fermentação da glicose, com ou sem produção de gás; coloração negra revelando a ocorrência de produção de H₂S.

As cepas isoladas que se revelavam produtoras destas reações eram, a seguir, submetidas a provas bioquímicas de identificação, ou seja: da desaminação da fenilalanina, da produção de urease, da descarboxilação da lisina, da utilização de carboidratos (glicose, lactose, manitol e sacarose), do malonato e do citrato, da produção de indol e teste de motilidade.

Prova da desaminação da fenilalanina (EWING e cols.³¹, 1957) - As cepas a serem estudadas eram semeadas em tubos contendo ágar fenilalanina inclinado. Os tubos, depois de inculados, eram incubados à temperatura de 37° C por 24 horas. Após a incubação, a cada tubo eram adicionadas algumas gotas de solução aquosa de Cloreto férrico a 10%. A prova era considerada positiva quando a superfície do meio em contato com o reagente apresentava-se com cor verde, devida à formação de ácido fenilpirúvico a partir da fenilalanina.

Prova da produção de urease (CHRISTESEN²³, 1946) - As cepas a serem identificadas eram semeadas, respectivamente, em um tubo contendo caldo uréia (meio de prova) e em um outro com o mesmo meio base, porém sem uréia (controle). Ambos os tubos inoculados eram incubados a 37° C por 24 horas, considerando-se a prova positiva quando o meio com uréia apresentava-se de cor rósea, devido à alcalinização dada pela produção de amônia pela ação da urease e o meio controle permanecia com sua coloração original amarela.

Prova da descarboxilação da lisina (FALKOW³², 1958) - As cepas em estudo eram inoculadas, respectivamente, em um tubo contendo meio com lisina (meio de prova) e em um tubo com o mesmo meio base sem lisina (meio controle), ambos cobertos por uma camada de óleo de vaselina estéril. Estes tubos eram incubados a 37° C por 24 horas. A prova era considerada positiva quando os meios contendo lisina mostravam-se com coloração púrpura clara e o meio controle, de cor amarela.

Prova da utilização de carboidratos (ICMSF⁵⁶, 1978) - As cepas a serem testadas eram inoculadas em tubos contendo caldo vermelho de fenol adicionado, respectivamente, de glicose, lactose, sacarose e manitol seguido de incubação a 37° C por 24 horas. Os tubos com glicose continham um tubo invertido de fermentação de Durham. Após a incubação, a prova era considerada positiva quando ocorria acidificação do meio, revelado

pela viragem da cor vermelha original do meio, para a amarela. Nos tubos contendo glicose verificava-se também se ocorria ou não a presença de gás no tubinho de Durham.

Prova da utilização do Malonato (LEIFSON,⁶⁷ 1933) - As cepas em estudo eram semeadas em tubos contendo malonato, sendo estes, a seguir, incubados a 37^o C durante 24 horas. A prova era considerada positiva quando se produzia a alcalinização do meio, evidenciada pela mudança da cor original verde para a azul.

Prova da utilização do citrato (EDWARDS & EWING,²⁹ 1962) As cepas a serem identificadas eram semeadas na superfície inclinada de ágar citrato de Simmons em tubos, sendo estes, posteriormente, incubados a 37^o C durante um período de até 96 horas. A prova era considerada positiva quando o meio se apresentava de cor azul.

Prova da produção de Indol (EDWARDS & EWING,²⁹ 1962)- As cepas eram semeadas em tubos contendo água peptonada, seguida da incubação a 37^o C durante 24 horas. Após a incubação, às culturas era adicionado 0,5 ml de reativo de Kovacs. A prova era considerada positiva quando se formava um anel róseo na superfície de contato do reagente com o meio.

Prova de Motilidade (KELLY & FULTON,⁶³ 1953; BIER,¹² 1975) As cepas a serem testadas eram semeadas, por picada profunda, em tubos contendo ágar motilidade, sendo estes incubados, a seguir, a 37^o C durante 24 horas. Após a incubação, a prova era considerada positiva se ocorresse crescimento bacteriano difuso ao longo da linha de semeadura.

3.6.3. Provas Sorológicas

Após a realização das provas bioquímicas, as cepas que se apresentavam com características de Salmonella, eram submetidas a provas de soro-aglutinação

rápida em lâmina para antígenos somático "O" e flagelar "H". Para a realização desta prova, eram utilizadas culturas de 24 horas a 37^o C em ágar simples inclinado. A partir de cada cultura, era preparada uma suspensão espessa em solução de cloreto de sódio a 0,85%.

A seguir, em placa de Huddleson, eram depositadas em caselas, separadas, três gotas dessa suspensão, sendo em uma delas adicionada uma gota de soro anti-salmonela polivalente somático "O" e em outra, soro polivalente flagelar "H". A 3^a gota restante era usada como controle para testar a auto-aglutinação da suspensão.

A seguir, procedia-se à homogeneização das misturas, através de movimentos circulares imprimidos à placa, com inclinação leve da mesma para os lados. A prova era considerada positiva quando, em alguns minutos, era evidenciada reação de aglutinação nas misturas, soro-antígeno e ausência desta reação na gota-controle. As cepas que se revelavam positivas à prova de soro-aglutinação frente aos soros polivalentes "O" e "H" eram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para realização das identificações dos seus sorotipos.

3.7. PESQUISA DE C. PERFRINGENS TIPO A

3.7.1. SEMEADURA INICIAL

Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo com diâmetro de, aproximadamente, 3 mm, foi semeada uma alçada do sedimento resultante da centrifugação da amostra (item 3.5) em tubos contendo, nas suas paredes, meio RCA ("Reinforced Clostridium Agar") pré-reduzido. Estes tubos eram inoculados, segundo a técnica de esgotamento em estrias ("Roll tube") e, a seguir, incubados a 37^oC por 24 e 48 horas (SUTTER e cols.¹⁰², 1975).

O sistema usado para produção de anaerobiose era o da injeção de CO₂ nos tubos contendo o meio de cultura e fechados com rolha de borracha. Toda vez que os tubos eram abertos, a operação processava-se simultaneamente à introdução de CO₂, a fim de manter-se o ambiente sempre reduzido.

3.7.2. ISOLAMENTO DE COLÔNIAS SUSPEITAS

Nos tubos em que ocorria crescimento, eram selecionadas e isoladas até 5 colônias, sendo estas, em seguida, semeadas em tubos contendo meio de tioglicolato de sódio, pré-reduzido por aquecimento, seguido de injeção de CO_2 . Estes tubos eram incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação, havendo crescimento bacteriano, eram preparados esfregaços corados pelo método de Gram, para a verificação da morfologia e pureza da cultura, e pelo método de Wirtz, para a constatação da formação de esporos. Sendo comprovada a presença de bacilos Gram-positivos curtos, grossos, com extremidades arredondadas e não esporulados, as culturas dos tubos correspondentes eram submetidas a provas de identificação (ICSMF,⁵⁶ 1978).

3.7.3. IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS ISOLADAS

Prova da Atividade Hemolítica

A partir de culturas puras, em caldo tioglicolato, com 24 horas de incubação, eram semeadas placas de ágar sangue, sendo estas incubadas a 37°C durante 24 horas, em condições de anaerobiose, empregando-se o sistema Gas-Pak. Após a incubação, eram escolhidas até 5 colônias brancas, de bordas irregulares, apresentando-se com halo de hemólise simples ou dupla, ou não hemolíticas (HALL e cols.,⁴⁴ 1963).

Prova da Produção de Lecitinase

Das culturas de ágar-sangue, as colônias selecionadas eram isoladas e semeadas em estria na superfície de ágar gema de ovo em placas, as quais eram, a seguir, incubadas a 37°C durante 24 horas. A prova era considerada positiva quando produzia-se um halo de precipitação ao redor do crescimento bacteriano, devido

à produção de lecitinase (HALL e cols.⁴⁴, 1963).

Prova de Hidrólise da Gelatina e Fermentação da Lactose

A partir das culturas positivas na prova de produção de lecitinase, eram inoculados tubos contendo meio de lactose-gelatina e estes, incubados a 37^o C por 24 horas em condições de anaerobiose. A prova era considerada positiva para a fermentação da lactose quando havia mudança de cor, para o amarelo, devida à acidificação do meio. A hidrólise da gelatina era constatada por meio da liquefação do meio, o qual permanecia líquido, mesmo após ter sido submetido a esfriamento em um recipiente contendo água a, aproximadamente, 4^o C (ICMSF,⁵⁶ 1978).

Prova da Motilidade e da Redução do Nitrato

A partir das mesmas culturas produtoras de lecitinase inoculavam-se, por picada profunda, tubos contendo meio nitrato-motilidade. Estes tubos eram incubados a 37^o C por 24 horas em condições de anaerobiose. Após a incubação, eram adicionados 0,1 ml de reagente A (ácido sulfúrico a 0,8% e ácido acético a 30%) e 0,1 ml do B (alfa naftil-amina a 0,5% e ácido acético a 30%) para prova de nitrato. A prova era considerada como sendo positiva quando ocorria a produção de cor rosa ou vermelha, indicativa da presença de nitrito nos tubos, devido à redução do nitrato realizada pelos microrganismos.

As cepas produtoras de lecitinase, imóveis, redutoras do nitrato, produtoras de gelatinase e fermentadoras da lactose eram, posteriormente, submetidas à prova de Nagler para identificação sorológica.

Prova de Nagler

Na realização desta prova eram utilizadas placas contendo Ágar-gema de ovo de McClung-Toabe. Estas placas eram divididas, em duas partes iguais, por uma linha traçada no verso. Em uma das partes eram depositadas sobre o meio, 3 gotas de antitoxina correspondente ao C. perfringens tipo A e em seguida, espalhadas com bastão de vidro em "L", tomando-se cuidado para não invadir a outra metade da placa. Nas placas assim preparadas eram semeadas as cepas a serem identificadas em uma estria perpendicular à linha divisória, partindo a inoculação da metade de meio sem antitoxina.

Esta prova era considerada positiva quando havia crescimento ao longo da semeadura, rodeado de um halo de precipitação somente na parte da placa sem antitoxina (ICMSF,⁵⁶ 1978).

4 . RESULTADOS .

De acordo com o que foi exposto, a partir das 50 amostras de água de escaldamento coletadas e empregando-se as técnicas descritas, foram determinados o NMP por 100 ml de bactérias coliformes fecais e de estreptococos fecais e foram pesquisadas bactérias do gênero Salmonella e C. perfringens, sendo os resultados mostrados a seguir.

Na tabela 1 acham-se distribuídos os valores de NMP por 100 ml de água, de bactérias coliformes fecais e estreptococos fecais, os sorotipos de bactérias do gênero Salmonella e C. perfringens, pH e temperaturas das amostras.

Na tabela 2 mostram-se os valores mínimos e máximos dos NMP por 100 ml de água das bactérias coliformes fecais e estreptococos fecais.

Na tabela 3 estão distribuídos os números e porcentagem das amostras de água, segundo o NMP de bactérias coliformes fecais e estreptococos fecais.

TABELA 1

Número Mais Provável (NMP) por 100 ml de bactérias coliformes fecais e estreptococos fecais e de bactérias do gênero *Salmonella* e *C. perfringens* tipo A, pH e temperaturas de amostras de água de esgoto de matadouro de suínos. Carapicuíba, 1981/82.

nº da amostra	pH	temperatura (°C)	NMP/100 ml		ISOLAMENTO	
			coliformes fecais	estreptococos fecais	<i>Salmonella</i>	<i>C. perfringens</i> tipo A
1	6,8	64	<3	4.300	(-)	-
2	6,8	64	43	9.300	<i>S. typhimurium</i>	-
3	6,5	62	4	23.000	(-)	-
4	6,5	60	230	21.000	<i>S. anatum</i>	-
5	7,0	62	<3	21.000	(-)	-
6	6,5	62	460	15.000	(-)	-
7	6,5	61	430	1.100.000	(-)	-
8	7,5	62	93	93.000	(-)	-
9	6,5	62	150	1.100.000	(-)	-
10	7,0	62	4	930	(-)	-
11	7,0	62	<3	4.300	(-)	-
12	7,0	61	150	2.300	(-)	-
13	7,0	62	<3	4.300	(-)	-
14	7,0	62	<3	1.500	(-)	-
15	6,0	62	93	75.000	(-)	-
16	6,0	62	<3	930	(-)	-
17	7,0	64	<3	4.300	(-)	-
18	7,0	62	21	2.300	(-)	-
19	7,5	62	<3	75.000	(-)	-
20	7,0	62	4	2.300	(-)	-
21	6,3	63	430	4.300	<i>S. anatum</i>	-
22	7,0	62	9	21.000	(-)	-
23	7,0	62	21.000	930	(-)	-
24	7,0	63	9	2.300	(-)	-
25	7,0	62	<3	230	(-)	(-)
26	6,8	63	230	230	(-)	(-)
27	7,0	62	23	930	(-)	(+)
28	7,0	63	<3	4.300	(-)	(-)
29	7,0	62	93	2.300	(-)	(-)
30	6,8	63	43.000	9.300	(-)	(+)
31	7,0	63	15	930	(-)	(+)
32	6,8	63	23	4.300	(-)	(-)
33	7,0	63	23	930	(-)	(+)
34	6,8	62	230	430	(-)	(-)
35	7,0	63	9	4.300	(-)	(-)
36	7,0	64	<3	430	(-)	(-)
37	7,0	61	75	9.300	(-)	(-)
38	7,0	62	<3	430	(-)	(+)
39	6,8	63	150	1.500	(-)	(-)
40	7,0	62	230	2.300	(-)	(+)
41	6,0	60	430	4.300	(-)	(-)
42	6,5	62	4	2.300	(-)	(-)
43	7,0	61	93	75.000	(-)	(-)
44	6,5	63	95	2.300	(-)	(+)
45	7,0	63	430	2.300	(-)	(-)
46	6,5	60	15	9.300	(-)	(-)
47	7,0	60	23	930	(-)	(+)
48	6,8	60	9	7.500	(-)	(-)
49	6,0	63	<3	4.300	(-)	(+)
50	7,0	63	4	9.300	(-)	(+)

(-) = negativo

(+) = positivo

- = não investigado

TABELA 2

Valores mínimos e máximos do Número Mais Provável (NMP) por 100 ml de bactérias coliformes fecais e estreptococos fecais por 100 ml de amostra de água de escaldamento de matadouro de suínos. Carapicuíba, 1981/82.

Valores	NMP/100 ml	
	Coliformes fecais	Estreptococos fecais
Mínimos	<3	230
Máximos	43.000	1.100.000

TABELA 3

Distribuição dos números e porcentagem das amostras de água de escaldamento de matadouro de suínos segundo o Número Mais Provável (NMP) por 100 ml de bactérias coliformes fecais e estreptococos fecais. Carapicuíba, 1981/82.

NMP/100 ml	AMOSTRAS POSITIVAS			
	Coliformes fecais		Estreptococos fecais	
	nº	%	nº	%
0 — 3	13	26,0	-	-
3 — 10 ²	23	46,0	-	-
10 ² — 10 ³	12	24,0	12	24,0
10 ³ — 10 ⁴	-	-	27	54,0
10 ⁴ — 10 ⁵	2	4,0	9	18,0
10 ⁵ — 10 ⁶	-	-	-	-
10 ⁶ — 10 ⁷	-	-	2	4,0
10 ⁷ — 10 ⁸	-	-	-	-
Total	50	100,0	50	100,0

5. DISCUSSÃO.

5. DISCUSSÃO

Analisando-se a tabela 1 verifica-se que foram encontradas bactérias coliformes fecais e estreptococos fecais das águas de escaaldamento estudadas. Porém podemos observar que em 13 (26,0%) das amostras analisadas, o NMP por 100 ml para coliformes fecais foi <3 , resultados estes que consideramos como sendo negativos para a presença dessas bactérias, por corresponder à ausência de crescimento nos tubos semeados. Entretanto, as 50 (100%) amostras pesquisadas mostraram-se com a presença de estreptococos fecais.

Em relação aos valores mínimos e máximos encontrados na tabela 2, podemos constatar também uma acentuada diferença entre os resultados obtidos na pesquisa de ambas as bactérias sendo, respectivamente, <3 e 43.000/100 ml para coliformes, e 230 e 1.100.000/100 ml para estreptococos.

Quanto a coliformes fecais, na tabela nº 3 podemos verificar que das 50 amostras, 48 (96,0%) revelaram-se com valores dos NMP inferiores a 10^3 por 100 ml, existindo somente 2 (4,0%) das amostras analisadas com valores muito superiores e portanto, discrepando dos demais.

Com relação a estreptococos, pode-se constatar na mesma tabela que só 12 (24,0%) amostras apresentaram valores inferiores a 10^3 /100 ml, sendo que em 38 (76,0%) os NMP/100 ml de água obtidos foram superiores a 10^3 . A exemplo dos coliformes fecais, observaram-se também apenas 2 (4,0%) valores discrepantes, ou seja, os NMP de estreptococos fecais se mostraram muito elevados.

Deve-se observar, porém, que as amostras com resultados discrepantes para coliformes fecais não correspondiam às discrepantes, relativamente a estreptococos fecais.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados em nossa pesquisa anterior (SILVA CAMPS⁹⁷, 1980), na qual concluímos que nas condições de nosso trabalho os estreptococos fecais pareciam ter-se revelado melhores indicadores na constatação da presença de poluição fecal do que os coliformes fecais, em águas de escaaldamento de suínos.

A presença destas bactérias, coliformes fecais e estreptococos fecais, não constituiriam um risco "per se", mas indicariam que nestas águas existe a possibilidade da presença de outras bactérias de origem entérica.

De fato, a água empregada em qualquer processo nas indústrias de alimentos deve ser potável, incluindo a do tanque de escaldamento no início do abate. Assim sendo, a poluição encontrada nas amostras de água analisadas deve ser originária tanto da matéria fecal que o suíno comumente carrega na sua pele como da defecação reflexa que, muitas vezes, ocorre no tanque.

Os microrganismos presentes nas fezes dos suínos têm sido amplamente estudados. A partir dos trabalhos pioneiros de HORMAECHE & SALSAMENDI⁵³ (1946) no Uruguai, demonstrou-se que o suíno é um importante elo na cadeia de transmissão de bactérias do gênero Salmonella ao homem. Estes microrganismos têm seu habitat natural no trato intestinal do homem e principalmente dos animais e tem sido comprovado que dos animais abatidos para consumo humano, o suíno é o que apresenta maior índice de infecção intestinal por salmonelas.

Também nas fezes do suíno tem sido verificada a presença de outras bactérias que também possui grande interesse em Saúde Pública - o Clostridium perfringens.

Relacionando estes dados, seria possível concluir que a presença de coliformes fecais e de estreptococos fecais nas águas usadas no processo de escaldamento nos matadouros de suínos, indicam a existência de um risco de estarem elas também contaminadas por outras bactérias intestinais, frequentemente presentes nas fezes de suínos e comprovadamente patogênicas para o homem, tais como Salmonella sp. e C. perfringens.

Observando-se ainda a tabela 1, podemos constatar que foram isoladas cepas de Salmonella typhimurium da amostra de número 2 e de S. anatum das de números 4 e 21. Nestas amostras de água de escaldamento, as temperaturas constatadas foram de 64° C na amostra número 2 e de 60° C e 63° C, respectivamente, nas de números 4 e 21. O primeiro fato que chama nossa atenção é a alta temperatura apresentada pela amostra número 2, da qual obteve-se o isolamento de Salmonella.

É preciso considerar, porém, qual a resistência

que estes microrganismos patogênicos apresentam às temperaturas das águas por nós estudadas.

A resistência térmica das bactérias do gênero Salmonella é, em geral, baixa, sendo destruídas por tratamentos térmicos suaves. Entretanto, muitos fatores condicionam sua maior ou menor tolerância ao calor, entre os quais podem ser considerados como fundamentais, o substrato em que a bactéria se encontra quando é aquecida, assim como o pH do meio.

Segundo BOWMER¹⁴ (1965), a maioria das salmonelas é destruída pela exposição a 55° C durante 1 hora ou a 60° C durante 15 a 20 minutos. DELCHEV & SAVOV²⁶ (1968), estudaram o tempo de destruição das salmonelas empregando diferentes temperaturas e concluíram que estas bactérias permaneciam viáveis durante 1 hora a 59° C e por 20 minutos entre 61° C e 63° C.

AMEMEIYA & NAKASHIMA² (1973) realizaram um estudo completo das águas de escaldamento no que diz respeito às condições higiênicas das mesmas em relação ao número de animais processados. Neste trabalho, os autores verificaram um aumento na termorresistência apresentada por algumas bactérias devido à presença de matéria orgânica nas amostras de água por eles analisadas.

Grandes quantidades de matéria orgânica (urina, fezes, sangue) também foram constatadas em nossas amostras.

Por outro lado, deve ser salientado que nos estudos realizados por DELCHEV & SAVOV²⁶ (1968), foram testadas culturas puras de salmonelas, estudos estes desenvolvidos em laboratório, onde as temperaturas podem ser controladas e mantidas uniformes, o que não sucede com o tanque de escaldamento. Este deve registrar variações em alguns pontos devido a seu tamanho e à entrada de novos suínos a serem escaldados.

De outra parte, outros autores têm isolado salmonelas a partir de águas de escaldamento. Assim, CHUA e cols.²², (1977), examinaram 20 amostras de água e isolaram de duas o sorotipo S. anatum e de uma o S. derby; nesta pesquisa os autores concluíram que a temperatura de 60° C apresentada pelo tanque de escaldamento, durante uma exposição de 5 minutos, era suficiente para matar as salmonelas que eram injetadas no sistema.

GALTON e cols.³⁶ (1956), também em um detalhado estudo realizado com a finalidade de verificar a influência do

matadouro na contaminação por salmonelas, encontrada na carne e produtos cárneos de suíno, não isolou este microrganismo da água de escaldamento. Estes autores não referem a técnica empregada nem o número de amostras estudadas. Acreditamos que estes resultados negativos provavelmente foram devidos a não ter sido realizada a concentração das amostras de água e ao pequeno número de amostras examinadas. Considerando-se que: 1) este autor encontrou 27 (7,2%) dos 374 suínos examinados, a nível de fazenda, positivos para a presença de salmonela no reto; 2) que essa proporção se elevou para 78% de positivos a nível de currais; 3) que ao examinar 1.883 superfícies das carcaças, encontrou 966 (51%) positivas, podemos deduzir que provavelmente toda a linha de produção se encontrava mais ou menos contaminada e não vemos o porquê de ser uma exceção a água de escaldamento, já que em nosso estudo verificamos, comumente, a emissão de fezes pelo suíno durante o escaldamento. É fora de dúvida que esta água, nas primeiras etapas do processamento, poderia contribuir para a diminuição da carga microbiana que o suíno carrega na pele, mas à medida que aumenta o número de animais abatidos, a água vai-se contaminando com microrganismos e matéria orgânica, fazendo com que ela possa se converter em fonte de contaminação das carcaças, sobretudo microrganismos patogênicos, tais como salmonela, como nós mesmos comprovamos.

GANVILLE e cols.³⁷ (1967), em pesquisa de salmonela em água de escaldamento, estabelecem que a temperatura da água do tanque seria suficiente para destruir as salmonelas que estes animais possam apresentar na sua pele. Em seu trabalho, a temperatura variava de 59° a 62° C, sendo que o tempo de permanência do suíno era de 4'30'' a 6'30''. Os autores atribuíram a isto, o fato de não terem isolado salmonelas das 10 amostras por eles estudadas.

A ausência de salmonelas nestas águas, porém, poderia dever-se ao fato destes autores terem utilizado 1 litro de água diretamente na inoculação do meio de enriquecimento, sem prévia concentração da amostra.

HOFER & COSTA⁵² (1972), em pesquisa de salmonela em esgoto, estabeleceram a necessidade de se realizar concentração das amostras de água antes de se proceder ao enriquecimento, sob risco de se obterem resultados negativos. Um dos sistemas de concentração por nós utilizados é o que estes auto

res empregaram nessa pesquisa, ou seja, o da centrifugação a 2.000 rpm durante 15-20 minutos.

A necessidade de concentrar as amostras de água para realizar pesquisa de microrganismos patogênicos, tais como salmonela, já foi sentida por VALLENT (1901), citado por PESO⁸⁴ (1947), que produzia no líquido em estudo um precipitado por ação de uma solução de tiossulfato de sódio sobre nitrato de chumbo previamente dissolvido nesse líquido.

A partir deste trabalho são muitos os autores que apresentaram novos métodos de concentração ou aperfeiçoaram os já existentes. Um deles, o de WILSON (1905), citado por PESO⁸⁴ (1947), modificado por DIENERT & GUILLERD (1918), citado por PESO⁸⁴ (1947), foi por nós escolhido e empregado em nossa pesquisa-piloto, tendo sido trocado pela técnica proposta por ENGLAND³⁰ (1972), técnica esta que é simplesmente uma modificação da anterior, introduzidas algumas vantagens com respeito à possibilidade de armazenar o hidróxido de alumínio, evitando a sua preparação no momento de ser empregado.

Um outro fator que deve ser considerado como limitante da sobrevivência dos microrganismos, além da temperatura, é o pH. Em relação ao pH das águas de escaldamento por nós examinadas, observando a tabela 1, pode-se constatar que os valores encontrados variaram de 6,0 a 7,5.

Em geral, pode-se considerar que a resistência térmica das bactérias diminui em pH abaixo de 4,5 e acima de 9,0. A este respeito, DOCKERTY e cols.²⁷ (1970), em trabalho realizado em três abatedouros, procurando comprovar quais os pontos em que a carcaça do suíno é contaminada e a influência que cada um deles exerce sobre a contaminação final da mesma, frisa a importância do pH da água do tanque de escaldamento. Segundo suas observações, o escaldamento sob condições de alcalinidade seria um fator importante em relação ao nível de contaminação microbiana encontrado na superfície da carcaça, ao final do processamento.

Os pH por eles encontrados, ao redor de 12,0 nos três matadouros examinados, são muito mais elevados do que os que foram por nós observados no presente estudo.

SNIJDER¹⁰⁰ (1975), estuda as diferentes técnicas de escaldamento em 8 abatedouros de suínos, comparando as con-

dições higiênicas da água usada durante este processo. Neste trabalho, concluem que a temperatura acima de 60° C e pH elevado, são importantes para diminuir o número de bactérias da água nas diferentes técnicas estudadas.

Através de vários trabalhos realizados, pode-se constatar que é comum em países europeus o uso de produtos, tais como cal e potassa, para manter um alto pH na água de escaldamento. No Brasil, não existe, praticamente, esta preocupação po rém esta prática, se adotada, poderia contribuir para diminuir a carga microbiana da água de escaldamento e, ao mesmo tempo, à produção de carne suína de melhor nível higiênico.

Outros autores propõem o uso de substâncias desinfectantes para reduzir a carga microbiana em água de tanque de escaldamento. PANETTA e cols.⁸¹ (1977), estudaram a ação que o Paratolueno-Cloro-Sulfamida-Sódico produz sobre vários grupos de bactérias contaminantes da água de escaldamento. Nos seus re sultados fica patente a eficiência desta substância, tendo esses autores conseguido a redução do número de bactérias do grupo coliforme e de enterococos de 100% e 70%, respectivamente.

Dado que as condições de pH e temperatura da água do tanque de escaldamento podem permitir a sobrevivência de grupos de bactérias como salmonelas por 15 a 20 minutos, neste tempo se renovaria a carga microbiana da água por novas entradas de suínos, formando-se um fluxo constante.

As desvantagens que o método convencional de escaldamento podem ter, foram reconhecidas por muitos autores. De um lado, a contaminação cruzada que pode ocorrer entre a superfície externa (pele) no tanque; de outro, a água de escaldamento poderia penetrar pelos orifícios naturais e pelo ferimento de sangria.

É fácil verificar que a água de escaldamento pas sa através dos orifícios nasal e oral aos pulmões, razão pela qual na maioria dos países onde é empregada a técnica do tanque para o escaldamento dos suínos, os pulmões não são usados para consumo humano.

A suspeita de que a água de escaldamento poderia penetrar pelo ferimento de sangria e, por via vascular, espalhar -se pelos vários órgãos e tecidos musculares, foi levantada por diversos autores, embora não existisse um trabalho, até recente

mente, que pudesse demonstrar objetivamente o fato. JONES e cols.⁵⁹ (1979), idealizaram um estudo que não deixa dúvida sobre a penetração da água pelo ferimento. Até o momento os autores interessados no estudo deste aspecto, de grande importância sanitária no abate de suínos, só conseguiram detectar a existência de bactérias similares às existentes no tanque, na porção torácica e/ou lombar da aorta. Os métodos por eles usados sempre foram microbiológicos, porém JONES e cols.⁵⁹ (1979) usaram partículas marcadas com isótopos radioativos. Estes autores misturaram estas substâncias com a água do tanque e após o escaldamento colheram 111 amostras de vários tecidos de suínos abatidos, das quais 109 revelaram radioatividade. A pele e os grandes vasos sanguíneos torácicos revelaram intensa radioatividade. A maioria das amostras de vasos sanguíneos que não os torácicos revelaram intensa radioatividade, se bem que não tanto quanto a dos grandes vasos torácicos. Os pulmões de dois dos suínos revelaram resultados semelhantes aos dos vasos. Em nossa opinião, esse trabalho preenche uma lacuna na cadeia de transmissão de salmonelas do suíno ao homem, pela carne contaminada. Vemos que há incriminação do tanque de escaldamento não só na contaminação superficial, mas também na profunda, o que é mais importante.

Comprovada a presença de salmonelas na água de escaldamento, resta saber se poderiam ser provenientes de animais sadios, já que todo suíno a ser abatido deve passar por rigoroso exame "ante-mortem" por parte da Inspeção Veterinária.

Já em 1946, HORMAECHE & SALSAMENDI⁵³ estudaram gânglios de suínos abatidos para consumo humano na procura de estabelecer a cadeia epidemiológica de transmissão de salmonelas ao homem. Nesse trabalho foram isoladas salmonelas de 22 dos 52 lotes examinados de gânglios mesentéricos. Os autores concluíram que a infecção crônica dos suínos sadios em Montevideo era muito frequente e que deviam ser estes animais considerados como uma importante fonte de contaminação para o homem.

Segundo ZEBRAL e cols.¹¹⁴ (1977), o mesmo fato foi verificado em diferentes regiões do mundo, destacando-se Holanda, Formosa, Argélia, Suíça, URSS, Irlanda, Canadá, Inglaterra e Estados Unidos da América do Norte.

No Brasil, PESTANA & RUGAI⁸⁷ (1943), estudando gânglios linfáticos mesentéricos, encontraram positividade de 15%. ASSUMPÇÃO⁷ (1948) constatou 19% de positividade em carnes

e derivados vendidos no varejo. NEIVA⁷⁹, também no mesmo ano, examinou fezes e gânglios mesentéricos de 354 suínos, encontrando positividade para Salmonella sp.. PERES⁸³ (1948) também obteve resultados positivos. Um achado muito importante é o de COSTA²⁵ (1972), isolando salmonela de gânglios linfáticos pré-esca-pulares e pré-crurais, que permanecem na carcaça. ZEBRAL e cols.¹¹⁴ (1977) realizaram também o exame destes gânglios em suínos abatidos para consumo em Rio de Janeiro e obtiveram o isolamento de salmonelas. Frente aos seus resultados, a necessidade de retirar estes gânglios da carcaça, foi preconizada.

No Brasil, a presença de salmonelas em carnes e produtos processados foi comprovada em 1946 por ASSUMPÇÃO⁷ em carnes suínas e bovinas; em 1947, por PESTANA & RUGAI⁸⁷, em língua de porco, salsicha e mortadela; em 1965, por IARIA e cols.⁵⁴, em quibe cru; em 1969, por MORENO e cols.⁷⁵, em língua fresca; em 1978, por PESSOA e cols.⁸⁶, em carne bovina; em 1979, por LEITÃO⁶⁸, em carne bovina e suína e em língua fresca; em 1980, por CERQUEIRA-CAMPOS²¹, em carne moída e, em 1982, por FARIA³³, em fígado bovino.

A presença deste microrganismo na carne reveste-se de grande importância em Saúde Pública, mas é na carne suína onde o risco é maior em vista de ser frequente o seu consumo sem tratamento térmico adequado.

De fato, carnes comumente tidas como cozidas são, em termos bacteriológicos, "não cozidas". A mudança de cor do vermelho para o cinzento, associada com o cozimento, ocorre a temperaturas próximas de 60° C, dependendo do tempo de exposição e da espessura da porção de carne; o centro de uma fatia de 15 mm de espessura, mal passada, apenas atinge os 40° C momentaneamente. Temperaturas de 40-60° C, especialmente de curta duração, não eliminam as células vegetativas bacterianas (ICMSF⁵⁵, 1980). A isto devemos acrescentar que as salmonelas não são inibidas pelo sal, nitritos, nem pelo pH de muitos produtos curados. Ainda que sejam facilmente destrutíveis pelo tratamento térmico, podem permanecer viáveis em embutidos crus maturados e crescer nas carnes curadas enlatadas e contaminadas por fugas após seu tratamento térmico.

Em geral, a incidência de determinado sorotipo de salmonela em alimentos de origem animal em determinada região está estreitamente ligada à sua incidência no homem e nos animais

(WATSON¹⁰⁹, 1975).

Onde existem registros adequados, tem sido demonstrado que um determinado sorotipo primeiramente registrado em rações importadas, aparece posteriormente em animais domésticos, para mais tarde ser isolado de surtos de toxinfecção alimentar do homem. Isto faz com que novos sorotipos possam aparecer em regiões muito distantes do lugar onde a contaminação teve lugar.

No Brasil, poucos são os dados existentes a respeito de prevalência de determinados sorotipos em animais e alimentos, assim como em casos ou surtos de toxinfecção alimentar.

ASSUMPÇÃO⁷ (1946), isolou S. anatum e Salmonella sp. de 10,2% das 49 amostras de carne e vísceras de bovino examinadas. Isolou de carne e fígado de suíno, S. anatum, S. give, S. london, S. reading, S. typhimurium, S. derby, S. newington, S. cholerae-suis var. Kunzendorf e S. paratyphi B., não referindo qual o sorotipo ou sorotipos predominantes.

PESTANA & RUGAI⁸⁷ (1947), examinando linguiça de porco, salsicha e mortadela, constatarem a presença de S. anatum, S. newport e S. minnesota.

IARIA e cols.⁵⁴ (1965), isolaram S. schottmülleri de amostras de quibe cru.

MORENO e cols.⁷⁵ (1969), isolaram salmonela (40,7%) das 60 amostras de linguiça fresca examinadas.

PESSÔA e cols.⁸⁶ (1978), isolaram, a partir de amostras de carne bovina, S. anatum, S. derby, S. infantis, S. minnesota, S. dublin, S. newport, S. takoradi, S. agona, S. typhimurium e S. bredeney, sendo que a frequência apresentada pelos diferentes sorotipos foi maior para S. anatum e S. derby.

LEITÃO⁶⁸ (1979), pesquisando salmonela em águas fluviais e em alimentos, tanto de origem animal como vegetal, isolou 21 sorotipos das 211 amostras que se revelaram positivas para esta bactéria. Destes 21 sorotipos, a S. anatum e a S. typhimurium foram as que se revelaram mais frequentes nas amostras de carcaças bovinas. Por sua vez, foram a S. derby e a S. anatum, as mais frequentemente isoladas de carne e linguiça fresca de suíno.

CERQUEIRA-CAMPOS²¹ (1980), examinando 50 amostras

de carne bovina moída, isolou três sorotipos de salmonela, a saber: S. anatum, S. typhimurium e S. dublin, sendo que nestes achados, a de maior frequência correspondeu à S. anatum.

GIORGI⁴² (1972), examinando fezes de diferentes espécies de animais domésticos, isolou salmonela de 217 (7,2%) das 3.020 amostras analisadas. Nesse trabalho, os suínos foram os que mostraram maior índice de contaminação, sendo que os sorotipos mais prevalentes nesta espécie foram S. derby e S. typhimurium.

Em nossa pesquisa, foram encontrados dois sorotipos de salmonelas (tabela 1): S. anatum e S. typhimurium.

Podemos constatar que nossos dados se mostram concordantes com os achados dos autores acima mencionados.

Por outra parte, no Brasil são poucos os estudos sobre surtos de toxinfecção alimentar causados por esta bactéria.

SILVA e cols.⁹⁸ (1964), relatam um surto de toxinfecção alimentar ocorrido em um hospital-escola de Salvador, Bahia, sendo o microrganismo responsável pelo surto a S. typhimurium e o alimento, carne bovina.

TAUNAY¹⁰⁵ (1968), relata o isolamento de S. hirschfeldii de 26 cepas isoladas durante um surto ocorrido entre funcionários de uma indústria de mineração, no Território Federal de Amapá. O alimento responsável pelo surto foi identificado como sendo o leite em pó usado na preparação de sorvete.

KOTAKA e cols.⁶⁴ (1979), isolam S. typhimurium das fezes de 68% dos indivíduos que apresentavam síndrome de toxinfecção alimentar. Este surto ocorreu em Curitiba, Paraná, no ano de 1978. O alimento envolvido não pôde ser identificado, mas seus dados sugerem que foi a maionese de batata servida.

É possível constatar, nos trabalhos acima citados, que tanto em produtos de origem animal como em isolamentos realizados de surtos de toxinfecção alimentar, como também em nossas águas, que é comum a presença de S. typhimurium e S. anatum.

Considerando o C. perfringens, na tabela 1 observa-se que esta bactéria foi isolada de 10 (40%) de 25 amostras de água estudadas. A presença desta bactéria era esperada

devido a que: 1) mostra-se amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada no trato intestinal do homem e de animais, podendo estar presente no solo, ar, poeira e água (HOBBS⁴⁷, 1965; NAKAMURA & SCHULTZE⁷⁸, 1970); 2) a pertencente ao tipo A e produtora de toxinfecção alimentar, pode produzir dois tipos de esporos: um, que é sensível à temperatura de 100° C por alguns minutos; outro, termorresistente, que suporta o aquecimento a 100° C por 1 hora; 3) as temperaturas verificadas em águas de escaldamento de suínos em pesquisa anteriormente realizada (SILVA CAMPS⁹⁷, 1980) e as constatadas no presente trabalho, nunca excederam os 64° C, permitindo, portanto, que qualquer que seja a cepa presente, suas formas esporuladas podem sobreviver nestas águas.

O trabalho de JONES e cols.⁵⁹ (1979) pode dar-nos uma medida do risco que esta bactéria acarreta quando presente na água. Em seu estudo, foi comprovada a penetração da água de escaldamento através do ferimento de sangria e sua posterior distribuição através dos grandes vasos, chegando até os tecidos e órgãos profundos. Este risco é melhor compreendido se consideramos algumas das características desta bactéria como, por exemplo, a termorresistência de seus esporos, que é muito importante, dada a sua capacidade de sobreviver a temperaturas de cocção a que o alimento é sujeito; embora o cozimento destrua as células vegetativas, ativa os esporos, os quais podem eventualmente germinar e multiplicar-se no baixo Redox do alimento cozido.

Por outro lado, é comum o uso de soluções salinas na conservação de carnes suínas e produtos derivados. A base desta técnica está no aumento da pressão osmótica e consequente diminuição da atividade aquosa afetando, assim, o crescimento bacteriano. Com relação ao C. perfringens, a atividade aquosa limite para o crescimento desta bactéria é de 0,95-0,96, dependendo do pH, cepa, tamanho e tipo do inóculo, da temperatura, e do tipo de soluto empregado para o ajustamento da Aa.

O C. perfringens é passível de crescer em concentrações salinas consideravelmente superiores que as da cura das carnes (nitrito e nitrato de sódio).

ANDO⁴ (1975) verificou que são necessários 2% de cloreto de sódio e níveis de 0,05% (500 ppm) de nitrato de sódio para prevenir o crescimento de C. perfringens.

O C. perfringens presente na água de escaldamento não só pode constituir perigo pela contaminação da massa muscular profunda, como também pela contaminação da superfície da pele do suíno. BALTZER & WILSON⁸ (1965) realizaram um trabalho onde determinaram o número de clostrídios presentes na pele do flanco de suínos, em vários pontos da linha de produção. Realizaram esta pesquisa por terem encontrado números elevados de clostrídios em muitos produtos nos quais a pele de suíno era usada na sua preparação. Altos números de bactérias são encontrados não só na pele dos suínos como também na água de escaldamento usada para o seu processamento.

Considerando-se as características do C. perfringens, sua resistência à temperatura, sua capacidade de sobreviver às concentrações salinas bastante elevadas e ainda que é uma bactéria anaeróbia mas que não requer condições estritas de anaerobiose, pode-se facilmente deduzir as grandes oportunidades que tem de sobreviver em alimentos como patês, salsichas, linguiças, etc. Estes alimentos são submetidos a um tratamento térmico débil ou simplesmente conservados com sal e sob refrigeração. Na preparação de todos eles, é empregada pele suína, que ajuda ligar a massa e proporciona proteína mais barata. Por conseguinte, podemos avaliar a importância que tem a contaminação superficial do suíno.

Convém salientar que, para o C. perfringens causar toxinfecção alimentar, é necessário que seu número seja suficientemente elevado no alimento (HOBBS & GILBERT⁴⁸, 1978) e, portanto, deve haver condições favoráveis à sua multiplicação.

Um dos fatores mais importantes com relação à sobrevivência e à multiplicação do C. perfringens no alimento, é a temperatura. Os diversos autores que têm estudado o comportamento deste microrganismo em relação à temperatura, discordam, especialmente, com a faixa de temperatura ótima a seu desenvolvimento. Para FRAZIER³⁴ (1976), estaria compreendida entre 43^o e 47^o C; para JAY⁵⁷ (1973), este microrganismo desenvolve-se bem em temperaturas de 37^o a 43^o C.

Seja qual for a temperatura ótima, o alimento, após o cozimento, pode passar por essa faixa de temperatura durante o esfriamento. Estando o alimento contaminado por esporos, estes podem facilmente sobreviver ao processo comum de cozimento e, durante o esfriamento, produzir as formas vegetativas. Es

tas formas podem multiplicar-se, especialmente quando o alimento passa pela faixa de temperatura ótima, constituindo o número suficiente por grama de alimento capaz de produzir a intoxicação alimentar.

De grande importância é o fato de que o alimento não precisa estar contaminado somente por esporos termorresistentes para produzir toxinfecção alimentar. Esporos termosensíveis podem sobreviver a temperaturas de cocção de alimentos.

Tem sido demonstrado amplamente a alta prevalência de C. perfringens tanto termorresistentes como termosensíveis em alimentos e, especialmente, em carnes frescas ou congeladas.

Para crescer, o C. perfringens requer alguns aminoácidos ou simples peptídeos e várias vitaminas. As carnes vermelhas e o frango são providos destas substâncias, pelo que têm sido usualmente envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar produzida por esta bactéria.

Nos inúmeros estudos de surtos de intoxicação alimentar causada por C. perfringens, pode-se depreender que os alimentos mais envolvidos são carnes preparadas, muitas vezes em grandes peças, as quais passaram por um esfriamento lento (HOBBS e cols.⁵⁰, 1953; SUTTON & HOBBS¹⁰⁴, 1968; DUNCAN²⁸, 1970; CENTER FOR DISEASE CONTROL¹⁹, 1975).

No Brasil, tem-se realizado estudos a respeito da presença desta bactéria em carnes e produtos derivados. SERRANO⁹⁵ (1976), isolou C. perfringens de linguiça e de salsicha, e de carne suína e bovina vendida na Cidade de Campinas. Por sua vez, ROBBS & ROBBS⁹⁰ (1979), constataram a presença desta bactéria em linguiça vendida no Rio de Janeiro. CERQUEIRA-CAMPOS²¹ (1980), isolou C. perfringens de carne moída vendida em São Paulo.

Diante de todos estes dados, surge a preocupação de como evitar a contaminação dos alimentos por esta bactéria. É impossível reduzir a ocorrência de C. perfringens na natureza devido à sua ubiqüidade. Também está presente no intestino de homens e animais, o que dificulta a eliminação de portadores entre os manipuladores de alimentos, como é possível de se fazer com portadores de salmonela.

A presença desta bactéria no intestino do homem e dos animais tem sido amplamente pesquisada. BRYAN¹⁷ (1969), numa revisão do assunto, estabelece que 2% a 100% das fezes humanas contêm C. perfringens tipo A, considerando que esta variação depende das diferenças da população amostrada. Em populações com precárias condições de higiene, a frequência de C. perfringens é maior do que naquelas que desenvolvem boas práticas higiênicas. A quantidade destes organismos pode variar de 10^2 - 10^4 por grama de fezes (BANWART⁹, 1980). Entretanto YAMAGISHI e cols.¹¹² (1976), estabelecem que pessoas adultas sadias podem excretar até 10^7 - 10^9 microrganismos por grama de fezes.

No Brasil, BRANT e cols.¹⁶ (1978), estudaram a prevalência de C. perfringens em manipuladores de alimentos, sendo examinados 100 empregados de um matadouro e 100 de um restaurante. Dos isolamentos, aproximadamente 95% das cepas eram de C. perfringens tipo A. As contagens bacterianas variaram entre 10^3 e 5×10^6 por grama de fezes.

A contaminação do alimento pelo homem deve ser controlada através do emprego de estritas normas de higiene durante a manipulação do mesmo (GENIGEORGIS⁴¹, 1975). A contaminação do alimento proveniente do próprio animal seria controlada através do emprego de normas sanitárias e higiênicas durante todo o processo de abate, incluindo o período de descanso nos currais e também o de transporte.

Todos os dados até agora colhidos e analisados nos levam a considerar o abatedouro como um elo fundamental na cadeia de produção de um alimento livre de contaminação.

Dos resultados obtidos por todos os investigadores citados, pode-se supor que os suínos nos abatedouros devem ser considerados potencialmente contaminados, pelo que dever-se-ia aprimorar as medidas higiênicas do abate e também durante o período de confinamento.

A este respeito, MUCCIOLLO⁷⁷ (1974), estabelece: "De nada adiantará, do ponto de vista sanitário, que construção e instalação obedeçam aos mais rigorosos e modernos requisitos de técnica, se os trabalhos foram conduzidos sem os imprescindíveis escrúpulos e conhecimentos de higiene".

Por sua vez, KAMPELMACHER e cols.⁶¹ (1961), destacam os riscos de contaminação através de facas, máquinas e

tanque de escaldamento.

Por outro lado, a higiene da carne é o resultado do trabalho efetuado pelos técnicos que atuam em todos os setores da Inspeção e Tecnologia dos produtos cárneos, com o objetivo precípuo de proporcionar ao público uma carne sã e prevenir qualquer perigo para a saúde pública.

Alcançar este objetivo e obter uma carne higiênica está na dependência do estado sanitário do animal e do ambiente que cerca todos os momentos do preparo daqueles alimentos e das condições de saúde, dos hábitos higiênicos e da destreza do pessoal envolvido no processo (MUCCIOLLO⁷⁷, 1974).

Segundo MUCCIOLLO⁷⁷ (1974), "o matadouro deixou de ter as características de simples sala de abate para se constituir em fábrica de transformação econômica, em alto grau, de todos os produtos resultantes da matança das espécies domésticas. Para alcançar essa finalidade tecnológica, dentro de irrepreensíveis condições higiênicas, a construção, o equipamento e as instalações devem ser orientadas de maneira que permitam a matança de centenas de animais por hora de trabalho, com baixo custo operacional e alto rendimento econômico".

Compatibilizar alto rendimento econômico e aprimoradas condições higiênico-sanitárias é o enorme desafio que todo higienista enfrenta. Na realidade, é necessária grande dose de bom senso e especialmente um amplo conhecimento sobre a epidemiologia das doenças causadas por microrganismos transmitidos pela carne, para se conseguir conciliar estes dois pontos fundamentais na produção de qualquer alimento.

No matadouro de suínos podemos constatar a existência de erros no manejo dos animais, assim como no processamento dos mesmos que, se corrigidos, poderiam contribuir para a produção de carne com boas condições higiênicas. A este respeito, é importante ser destacado o tempo e condições de confinamento, antes do abate.

No Regulamento Industrial e Sanitário de Produtos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura do Brasil, constata-se o artigo 110 do capítulo 1, que se refere à Inspeção "Ante-Mortem", estabelecendo: "É proibida a matança de qualquer animal que não tenha permanecido pelo menos 24 horas em descanso, jejum e dieta hídrica nos depósitos do estabelecimento." A seguir, menciona a possibilidade de reduzir este tempo

a critério do Inspetor.

Não existe uma limitação do tempo máximo de permanência em confinamento, o que deixa à indústria total liberdade, sendo comum os animais permanecerem 48 a 72 ou mais horas em confinamento nos currais dos abatedouros.

Estudos realizados em suínos assintomáticos em matadouros indicam um evidente aumento dos animais infectados durante o transporte, devido às condições de confinamento e pela demora no sacrifício (KAMPELMACHER e cols.⁶¹, 1961; SHOTTS⁴⁶, 1962).

Ainda, deve ser levado em conta, o fato de haver um grande aumento do número de animais portadores que excretam salmonelas sem apresentar sintomatologia alguma. Estes animais podem ser considerados fontes móveis de infecção e de contaminação. Não é possível descobrir-se estes tipos de animais nos exames de rotina realizados pelos Veterinários Inspectores, na ausência de sintomatologia clínica e de modificações anatomo-patológicas.

Isto leva a um provável aumento da contaminação cruzada e a uma grande carga de matéria fecal na pele, a qual é só parcialmente removida pela ducha que antecede à matança, vindo a ser efetivamente removida pela água do tanque de escaldamento, a qual recebe quantidades crescentes de matéria orgânica e microrganismos.

Diante do que foi amplamente discutido, podemos concluir que o abatedouro é o ponto crucial no que concerne à contaminação da carne suína com bactérias intestinais patogênicas e sua disseminação.

6. CONCLUSÕES.

6. CONCLUSÕES

- 1) Foi demonstrada a presença de bactérias indicadoras de poluição fecal (coliformes fecais e estreptococos fecais) nas águas de escaldamento no momento em que 200 suínos tinham sido processados.
- 2) Os NMP/100 ml da amostra de água variaram de <3 a 43.000 para coliformes fecais e de 230 a 1.100.000 para estreptococos fecais.
- 3) A água de escaldamento apresentou temperaturas que variaram entre 60^o C a 64^o C e pH que variou de 6,0 a 7,5.
- 4) A positividade para a presença de estreptococos fecais revelou-se maior que a observada para coliformes fecais.
- 5) Nas condições de nosso trabalho os estreptococos fecais parecem ter-se revelado como melhores indicadores de poluição de origem fecal, que os coliformes fecais, nas águas de escaldamento de suínos.
- 6) Foram isoladas bactérias do gênero Salmonella de 6% das 50 amostras estudadas, sendo os sorotipos identificados como S. typhimurium e S. anatum.
- 7) Foi isolado Clostridium perfringens tipo A de 40% de 25 amostras estudadas.
- 8) As condições apresentadas pelo tanque de escaldamento permitem a sobrevivência de bactérias de origem fecal, patogênicas para o homem e produtoras de toxinfecção alimentar, podendo ser uma importante fonte de contaminação da carne suína.
- 9) A regulamentação sobre o abate de suínos existente carece de bases epidemiológicas e a falta de regulamentação sobre o uso do tanque de escaldamento pode estar influenciando para aumentar o nível de contaminação da água de escaldamento por bactérias de origem entérica.

7. ANEXO I

PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E REAGENTES EMPREGADOS

1. Caldo lauril-sulfato-triptose (Difco)

De acordo com as instruções do fabricante, 35,6 g do meio desidratado eram agregados a 1.000 ml de água destilada, sendo a mistura aquecida até sua completa dissolução. O pH era ajustado a 6,8 e o meio, distribuído em volumes de 10 ml em tubos 15 X 150 mm, tendo em seu interior tubinhos de Durham invertidos. O meio era autoclavado a 121^o C durante 15 minutos e a seguir, resfriado rapidamente e mantido à temperatura ambiente.

Para a preparação desse meio com concentração , seguiam-se as mesmas etapas descritas, porém, usava-se o dobro da quantidade de meio desidratado e sua distribuição era feita em tubos 18 X 150 mm, com tubo de Durham.

2. Caldo E.C. (Difco)

Este meio era preparado segundo as indicações do fabricante. Assim sendo, 37,0 g do produto desidratado eram dissolvidos em 1.000 ml de água destilada e a mistura, aquecida até sua completa dissolução, tendo-se o cuidado de não atingir a temperatura de ebulição. O pH era ajustado em 6,9 e o meio , distribuído em volumes de 10 ml em tubos de 16 X 160 mm, contendo em seu interior um tubo de Durham invertido. A seguir, o meio era autoclavado a 121^o C por 15 minutos, resfriado rapidamente e mantido à temperatura ambiente.

3. Caldo dextrose-azida (Difco)

Segundo as instruções do fabricante, 34,7 g do meio desidratado eram adicionados a 1.000 ml de água destilada e a mistura, aquecida até sua total dissolução. O pH era ajustado em 7,2 e o meio, distribuído em volumes de 10 ml em tubos de 16 X 160 mm, seguido da sua autoclavação a 121^o C por 15 minutos. Após a esterilização, o meio era resfriado e mantido à temperatura ambiente. Para a preparação do meio com concentra-

ção dupla, seguia-se o mesmo procedimento, descrito para o caldo lauril-sulfato-triptose.

4. Caldo etil-violeta-azida (EVA) (BBL)

Este meio era preparado segundo as instruções do fabricante. Assim sendo, 35,8 g do produto desidratado eram agregados a 1.000 ml de água destilada e a mistura, aquecida até sua completa dissolução. Após o ajuste do pH em 7,0, o meio era distribuído em tubos de 16 X 160 mm, em volumes de 10 ml e esterilizado em autoclave por 15 minutos à temperatura de 121⁰ C. Após a esterilização, o meio era resfriado e mantido à temperatura ambiente.

5. Suspensão estoque de Hidróxido de Alumínio (ENGLAND³⁰ 1972)

Carbonato de Sódio 4M (Na_2CO_3) 3 ml
 Cloreto de Alumínio 50M (AlCl_3) 100 ml

Sob constante agitação, a solução de cloreto de alumínio era adicionada, lentamente, à solução de carbonato de sódio. Depois de completada a adição de cloreto de alumínio, continuava-se a agitar a mistura por mais 15 minutos. Após este tempo, realizava-se a centrifugação a 2.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante era descartado e o sedimento, ressuspenso em uma solução de cloreto de sódio 0,15M. A suspensão resultante era centrifugada a 2.000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante, descartado, e o sedimento, ressuspenso em solução de cloreto de sódio 0,15M. Esta suspensão era em seguida autoclavada a 120⁰ C durante 15 minutos e após o resfriamento era centrifugada e o sedimento, ressuspenso em 110 ml de cloreto de sódio 0,15M esterilizada. A suspensão assim preparada era estocada a 4⁰ C.

6. Caldo selenito-novobiocina

A 1.000 ml de água destilada eram adicionados 23 g do meio desidratado "Selenite Broth" (Difco) e a mistura, aquecida sob agitação frequente, até a completa dissolução do meio, tomando-se o cuidado de não atingir a temperatura de ebulição. O meio não pôde ser superaquecido. A seguir, adicionava

-se 0,04 g/litro do antibiótico novobiocina cálcica. O meio era distribuído, assepticamente, em volumes de 100 ml em frascos com capacidade de 250 ml, previamente esterilizados e tamponados e mantido à temperatura ambiente.

7. Meio de Rappaport-tetracionato modificado por Hofer (1ª modificação)

Este meio era constituído da mistura de cinco soluções, a saber:

Solução A: meio básico

Bacto triptona.	5,0 g
Cloreto de sódio p.a.	8,0 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.	1,6 g
Água destilada.	1.000 ml
pH final após esterilização: 6,5-6,8.	

Os ingredientes sólidos eram adicionados a 1.000 ml de água destilada fria e dissolvidos por aquecimento, evitando-se que o líquido atingisse a temperatura de ebulição. O meio era distribuído em volumes de 100 ml em frascos de 250 ml e, a seguir, autoclavado a 121°C , durante 15 minutos.

Solução B: solução aquosa de cloreto de magnésio a 40%, esterilizada em vapor fluente ou banho-maria a 100°C , durante 30 minutos.

Solução C: solução aquosa de verde malaquita a 0,4%, esterilizada em vapor fluente ou banho-maria a 100°C , durante 30 minutos.

Solução D: solução aquosa de tiossulfato de sódio a 20%, esterilizada em vapor fluente ou banho-maria a 100°C , durante 30 minutos.

Solução E:

Iodo.	5,0 g
Iodeto de potássio (KI) p.a.	8,0 g

Estes ingredientes eram dissolvidos em 40 ml de

água destilada e guardados em frasco âmbar protegido da luz.

Preparação do meio final

O meio final era preparado no momento de ser usado, adicionando-se, assepticamente, a cada 100 ml do meio básico, as demais soluções nos seguintes volumes:

Solução B (cloreto de magnésio a 40%)...	10 ml
Solução C (verde malaquita a 0,4%).....	3 ml
Solução D (tiossulfato de sódio a 20%)..	10 ml
Solução E (iodo-iodetada).....	2 ml

8. Ágar sulfito de bismuto (WILSON & BLAIR¹¹⁰, 1972)

A 1.000 ml de água destilada, eram adicionados 52 g do meio desidratado "Bismuth Sulfite Agar" (Difco), deixando-se a mistura em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. A seguir, o meio era aquecido, sob agitação frequente, até completa fusão do ágar, tomando-se o cuidado de não ser atingida a temperatura de ebulição. Realizava-se, em seguida, a distribuição do meio em volumes de, aproximadamente, 12 ml em placas de Petri de 15 X 100 mm. As placas eram usadas no mesmo dia do seu preparo.

9. Ágar xilose-lisina desoxicolato (XLD)

A 1.000 ml de água destilada, eram adicionados 57,0 g do meio desidratado "XLD Agar" (Difco), deixando-se em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. A seguir, o meio era aquecido, sob agitação frequente, até a sua completa dissolução. O meio era distribuído em volumes de, aproximadamente, 12 ml em placas de Petri de 15 X 100 mm.

10. Ágar verde brilhante

A 1.000 ml de água destilada, eram adicionados 58,0 g do meio desidratado "Brilliant Green Agar" (Difco), deixando-se em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. A seguir, o meio era aquecido, sob agitação frequente, até a completa fusão do ágar, tomando-se o cuidado de não ser atingida a temperatura de ebulição. O meio era esterilizado em autoclave a 121° C, durante 15 minutos e a seguir, distribuído em volumes

de, aproximadamente, 12 ml em placas de Petri de 15 X 100 mm.

11. Ágar tríplice açúcar-ferro (Merck)

Segundo as especificações do fabricante, eram adicionados a 1.000 ml de água destilada 65,0 g do produto desidratado e a mistura, aquecida até a total dissolução. O pH era ajustado a 7,4, sendo o meio, em seguida, distribuído em tubos de 12 X 120 mm, em volumes de 5 ml e autoclavado a 121° C durante 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em temperatura ambiente em posição inclinada, de forma a se ter, após a solidificação, uma coluna de, aproximadamente, 5 cm e uma superfície inclinada. Este meio era conservado a 4° C.

12. Ágar fenilalanina (EWING e cols.³¹, 1957)

DL-Fenilalanina.	2,0 g
Extrato de levedo.	3,0 g
Cloreto de sódio.	5,0 g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4).	1,0 g
Ágar.	12,0 g

Estas substâncias eram dissolvidas em 1.000 ml de água destilada e a mistura, aquecida até a total dissolução. O pH era ajustado em 7,3, sendo o meio, a seguir, distribuído em volumes de 4ml em tubos de 12 X 120 mm e autoclavado a 121° C durante 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram colocados em posição inclinada até solidificação do meio e a seguir, conservados a 4° C.

13. Meio com uréia (BIER¹², 1975)

Peptona.	1,0 g
Cloreto de sódio.	5,0 g
Fosfato monossódico (NaH_2PO_4).	2,0 g
Glicose.	1,0 g
Vermelho de fenol a 0,2%.	6,0 g
Uréia.	2,0 g

Estas substâncias, com exceção da uréia, eram dissolvidas em 1.000 ml de água destilada e o pH, ajustado a 6,8; o meio era dividido em duas porções de 500 ml, autoclava

do a 121°C por 15 minutos e, em seguida, resfriado a $45-50^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, a uma das porções de 500 ml de meio, adicionavam-se, assepticamente, 25 ml de solução de uréia a 20%, esterilizada por filtração em filtros Seitz. A outra porção de 500 ml do meio era utilizada na prova-controle. A seguir, tanto o meio de teste como o de controle, eram distribuídos em tubos de 12 X 120 mm em volumes de 3 ml e, a seguir, conservados a 4°C .

14. Caldo lisina (FALKOW³², 1958)

Peptona.	5,0 g
Extrato de levedo.	3,0 g
Glicose.	1,0 g
L-Lisina.	5,0 g
Púrpura de bromo cresol.	0,05 g

Os ingredientes eram dissolvidos, por aquecimento, em 1.000 ml de água destilada e o pH, ajustado em 6,8. A base era dividida em duas porções iguais; numa, adicionava-se o monoclórato de alta lisina a 0,5%, enquanto a outra porção era utilizada como controle. O meio era distribuído em tubos de 12 X 120 mm, em volumes de 2 ml e autoclavado a 121°C por 10 minutos. O meio era conservado a 4°C .

15. Caldo vermelho de fenol com carboidratos (Difco)

Segundo instruções do fabricante, 16,0 g do produto eram dissolvidos em 1.000 ml de água destilada e o pH, ajustado em 7,0. O meio era, em seguida, dividido em porções de 45 ml e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Paralelamente, eram preparadas soluções aquosas a 5% dos carboidratos a serem utilizados (glicose, lactose, manitol e sacarose), as quais eram esterilizadas por filtração. Posteriormente, a cada porção de meio eram adicionados 5 ml da solução de carboidrato correspondente e a mistura, distribuída em volumes de 5 ml em tubos de 12 X 120 mm. Estes meios eram conservados em geladeira a 4°C . Os tubos correspondentes à glicose continham tubo invertido.

16. Caldo malonato (Difco)

De acordo com as indicações do fabricante, 8,0g do meio desidratado eram dissolvidos, por aquecimento, em 1.000

ml de água destilada, sendo o pH da mistura ajustado em 6,7. O meio, assim preparado, era distribuído em volumes de 2 ml em tubos de 12 X 120 mm, esterilizado a 121^o C por 15 minutos e após o seu resfriamento, conservado a 4^o C.

17. Ágar citrato de Simmons (Merck).

De acordo com as indicações do fabricante, 22 g do produto desidratado eram adicionados a 1.000 ml de água destilada e a mistura, aquecida até completa dissolução. Após ajustar o pH em 7,0, o meio era distribuído em volumes de 3 ml em tubos de 12 X 120 mm e esterilizado em autoclave a 121^o C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos à temperatura ambiente e em posição inclinada até a solidificação do ágar. Em seguida, este era mantido em geladeira a 4^o C.

18. Água peptonada (THATCHER & CLARK¹⁰⁷, 1973)

Cloreto de sódio.	5,0 g
Peptona.	10,0 g

Estes componentes eram dissolvidos em 1.000 ml de água destilada, sendo o pH, a seguir, ajustado em 7,2. O meio era distribuído em tubos de 16 X 160 mm em volumes de 10 ml, autoclavado a 121^o C por 15 minutos e, em seguida, era mantido à temperatura ambiente.

19. Ágar motilidade (BIER¹², 1975)

Peptona.	10,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Cloreto de sódio.	5,0 g
Gelatina.	80,0 g
Ágar.	4,0 g

Estas substâncias eram adicionadas a 1.000 ml de água destilada e a mistura, aquecida até a sua total dissolução. Após ajustar o pH em 7,4, o meio era distribuído e este rilizado a 121^o C durante 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em posição vertical até a solidificação do ágar. Posteriormente, este meio era conservado em geladeira a 4^o C.

20. Meio RCA ("Reinforced Clostridia Agar") (Difco)

Segundo as especificações do fabricante, 38,0 g do produto desidratado eram dissolvidos, por aquecimento, em 1.000 ml de água destilada. O pH era ajustado em 6,8 e o meio, distribuído em volumes de 15 ml em tubos denominados "Roll tube" de 14 X 140 mm. Estes tubos, contendo o meio, eram mantidos em autoclave a 120° C durante 1 minuto, sendo suas bocas cobertas por papel de alumínio, para permitir a saída de ar. Em seguida, enquanto ainda quente, o meio era injetado com CO₂ e os tubos, tampados com rolhas de borracha. Logo a seguir, os tubos eram colocados em uma prensa que evitava a saída das rolhas pela pressão do gás aquecido e se procedia à autoclavagem por 15 minutos a 121° C. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em banho-maria fervente para que o meio permanecesse líquido. Em seguida, realizava-se a última etapa da sua preparação, que compreendia o depósito do meio nas paredes do tubo, formando uma camada fina uniforme. Isto se realizava através do uso de um rotor (SUTTER e cols.¹⁰², 1975) com capacidade para produzir 1.725 rpm.

Cada tubo levava aproximadamente 10 minutos neste aparelho para que se completasse a solidificação do meio em suas paredes. Antes de ser colocado no rotor, cada tubo era adicionado de 0,1 ml de vitamina K sob fluxo de CO₂. Este meio, assim preparado, era conservado à temperatura ambiente.

21. Emulsão de gema de ovo (BILLING & LUCKHURST¹³, 1957)

Eram utilizados ovos de galinha, lavados com água e sabão e enxaguados em água corrente. Estes ovos eram imersos em álcool etílico a 70% durante 2 horas, com a finalidade de desinfetar a superfície da casca. Em seguida, os ovos eram retirados da solução alcoólica, flambados, abertos assepticamente, e as suas gemas coletadas em proveta graduada esterilizada. Posteriormente, era adicionado igual volume de solução de cloreto de sódio a 0,85%, esterilizada.

Esta emulsão era transferida para um frasco Erlenmeyer estéril, com pérolas de vidro, onde se procedia à homogeneização da emulsão, por meio de suave movimento rotatório. Esta emulsão era mantida a 4° C.

22. Ágar gema de ovo de McClung & Toabe (THATCHER & CLARK¹⁰⁷, 1973)

Proteose peptona.	40,0 g
Fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). . .	5,0 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4). . . .	1,0 g
Cloreto de sódio.	2,0 g
Sulfato de magnésio.	0,1 g
Glicose.	25,0 g
Ágar.	25,0 g

Todas estas substâncias eram adicionadas a 1.000 ml de água destilada e a mistura, aquecida até a dissolução completa. A seguir, o pH era ajustado em 7,6 e o meio, esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Este meio básico era conservado a 4°C .

No momento de ser usado, o meio era fundido, resfriado até atingir a temperatura de 50°C e a cada 90 ml de meio básico, eram adicionados 10 ml de emulsão de gema de ovo. Em seguida, procedia-se à homogeneização do meio e a sua distribuição em volumes de 15 ml em placas de Petri estéreis. Após a solidificação de ágar, as placas eram mantidas a 4°C .

23. Ágar sangue de coelho a 5% (THATCHER & CLARK¹⁰⁷, 1973)

Extrato de carne.	3,0 g
Peptona.	5,0 g
Cloreto de sódio.	8,0 g
Ágar.	15,0 g

Estes ingredientes eram adicionados a 500 ml de água destilada e a mistura, aquecida até sua completa dissolução. Em seguida, após ter sido o seu pH ajustado em 7,3, o meio era esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, o meio era resfriado a 50°C e adicionado sangue citratado de coelho, na proporção de 5ml por 95 ml de meio básico. A seguir, procedia-se à homogeneização do meio, mediante agitação leve, e a sua distribuição, em volumes de 15 ml em placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação do ágar, as placas eram mantidas em geladeira a 4°C .

24. Meio de tioglicolato pré-reduzido (Difco)

De acordo com as especificações do fabricante, 25,7 g do produto desidratado eram adicionados a 1.000 ml de á

gua destilada e a mistura, aquecida até a sua completa dissolução. A seguir, o pH era ajustado em 7,0 e o meio, assim preparado, era distribuído em tubos especiais para anaerobiose, medindo 14 X 140 mm e contendo carbonato de cálcio em quantidade suficiente para cobrir o fundo do tubo. Os tubos eram tampados com papel de alumínio e, em seguida, mantidos a 120° C durante 1 minuto. Após este processo, era injetado CO₂ nos tubos com meio ainda quente, os quais eram, a seguir, tampados com rolha de borracha.

Estes tubos eram colocados em uma prensa, a fim de se evitar a saída das rolhas pela pressão do gás aquecido e autoclavados a 121° C por 15 minutos. Este meio era conservado a 4° C.

25. Ágar nitrato motilidade (ICMSF⁵⁶, 1978)

Ágar.	3,0 g
Galactose.	5,0 g
Nitrato de potássio.	1,0 g
Peptona.	5,0 g
Extrato de carne.	3,0 g
Glicerol.	5,0 g

Estas substâncias eram adicionadas a 1.000 ml de água destilada e a mistura, aquecida até dissolução total. O meio era distribuído em tubos de 16 X 160 mm, esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos e após o seu resfriamento, conservado em geladeira a 4° C.

26. Lactose-Gelatina (ICMSF⁵⁶, 1978)

Lactose.	10,0 g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄).	5,0 g
Triptose.	15,0 g
Extrato de levedo.	10,0 g
Vermelho de fenol (sol. 1%).	5 ml
Gelatina.	120,0 g

Estes ingredientes, com exceção da gelatina e do vermelho de fenol, eram dissolvidos, por aquecimento, em 1.000 ml de água destilada. Em seguida, procedia-se à adição da gelatina e a mistura era aquecida até a dissolução completa. Ao ser retirado do fogo, era adicionado o vermelho de fenol e o

pH, ajustado em 7,5. O meio, assim preparado, era distribuído em volumes de 6 ml em tubos de 16 X 160 mm, autoclavado a 121° C por 15 minutos e, após o seu resfriamento, mantido em geladeira a 4° C.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-ALFORD, J.A. & PALUMBO, S.A. Interation of salt, pH, and tempera
ture on the growth and survival of salmonellae in ground pork.
Appl. Microbiol., 17:528-532, 1969.
- 2-AMEMEYA, J. & NAKASHIMA, H. Hygienic studies on the slaughte
ring of pigs. Bull. Fac. Agric. Kagoshima Univ., 24:77-87, 1974.
- 3-AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the exa
mination of water and waste water. 14th ed. New York, 1975.
- 4-ANDO, Y. Estudios on germination spores of clostridias species ca
pable of causing food poisoning (VIII). Effect of some chemi
cals on growth from spores of heat-resistant strain of Clostri
dium perfringens Type A. J. Food Hyg. Soc. Jap., 16:30-33, 1975.
- 5-ANGELOTTI, R. et al. Quatitation of Clostridium perfringens in
food. Appl. Microbiol., 10:193, 1962.
- 6-ANGELOTTI, R. et al. Time-temperature effects on salmonellae and
staphylococci in foods. I. Behavior in refrigerated foods. Amer.
J. publ. Hlth., 51:76-88, 1961.
- 7-ASSUMPÇÃO, L. Pesquisa de bactérias do gênero Salmonella em carnes
e seus derivados vencidos a retalho. Arq. Hig. Saúde Publ., S.
Paulo, 29:473-486, 1946.
- 8-BALTZER, J. & WILSON, D. The ocurrence of clostridia on bacon slau
ghter lines. J. appl. Bact., 28:119-124, 1965.
- 9-BANWART, G. J. Basic food microbiology. Westport, Conn., AVI Pu
blishing, 1980.
- 10-BARUFALDI, R. et al. Levantamento das condições sanitárias da car
ne fresca moída, vendida no varejo. An. Farm. S. Paulo, 19:139-
148, 1979.
- 11-BECERRIL, P. et al. Búsqueda de portadores de Salmonella en dife
rentes grupos de población de la ciudad de México. Rev. lat-
amer. Microbiol., 21:115-119, 1979.

- 12-BIER, O. Bacteriologia e imunologia, em suas aplicações à medicina e à higiene. 16ª ed. São Paulo, Melhoramentos Ed. USP, 1977.
- 13-BILLING, E. & LUCKHURST, E. R. A simplified method for preparation of egg yolk media. J. appl. Bact., 20:90, 1957.
- 14-BOWMER, E. J. Salmonellae in food: a review. J. Milk. Food Technol., 28:74-86, 1965.
- 15-BRANT, C. P. et al. Factors influencing the prevalence of Glostridium perfringens type A in zebu beef cattle in the States de Minas Gerais and Goiás, Brazil - Rev. lat.-amer. Microbiol., 20:135-138, 1978.
- 16-BRANT, C. P. et al. Prevalence of Glostridium perfringens type A in two groups of food handlers in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil Rev. lat.-amer. Microbiol., 20:131-133, 1978.
- 17-BRYAN, F. L. What the sanitarian should know about Clostridium perfringens food borne illness. J. Milk Food Technol. 32:381-389, 1969.
- 18-CENTER FOR DISEASE CONTROL. Clostridium perfringens food poisoning:-California. Morb. Mort. Wkly Rep., 27:164-165, 1978.
- 19-CENTER FOR DISEASE CONTROL. current trends microbiologia standards for raw ground beef, cold cuts, and frankfurters. Morb. Mort. Wky. Rep., 24:229-30, 1975.
- 20-CENTER FOR DISEASE CONTROL. Foodborne and waterborne disease outbreaks. Annual summary., Atlanta, Ga., 1976.
- 21-CERQUEIRA-CAMPOS, M. L. Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium perfringens e bactérias do gênero Salmonella em carne moída, vendida no Município de São Paulo (1976-1977). São Paulo. (Tese de doutoramento - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- 22-CHUA, P. Y. et al. Salmonella in pig carcasses for human consumption in Hong Kong: a study on the mode of contamination. J. Hyg., Cambridge, 78:253-260, 1977.

- 23-CHRISTENSEN, W. B. Urea decomposition as a mean of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. J. Bact., 52:461, 1946.
- 24-CHRISTOVÃO, D. de A. Caracterização bacteriológica de poluição e contaminação padrões bacteriológicos. In: CENTRO TECNOLÓGICO DE SANEAMENTO BÁSICO. Água: qualidade, padrões de potabilidade e poluição. São Paulo, 1974. Cap. 6, p. 57-119
- 25-COSTA, G. A. et al. Sobre o isolamento de Salmonella de gânglios linfáticos de suínos abatidos no Matadouro da cidade de Salvador-Bahia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 70:417-431, 1972.
- 26-DELCHEV, H. & SAVOV, D. Investigations into the source of bacterial contamination of pork. II. In steaming. Vet. Med. Nauki, Sofia, 5:67-75, 1968.
- 27-DOCKERTY, T. et al. Microbial level of pork skin as affected by the dressing process. Anim. Sci., 30:884-890, 1970.
- 28-DUNCAN, C. L. Glostridium perfringens food poisoning. J. Milk Food Technol., 33:31-41, 1970.
- 29-EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. Identification of Enterobacteriaceae. 2. ed. Minneapolis, Burgess Pub., 1962.
- 30-ENGLAND, B. Comparison of the methods for concentration of the viral content of sewage and treated effluents. (Apresentado no 2nd. International Conference on Virology, 1972).
- 31-EWING, W. H. et al. Phenylalanine and malonate and their use in enteric bacteriology. Pub Hlth. Lab., 15:153, 1957.
- 32-FALCOW, S. Activity of lyne decarboxilase as and aid in the identification of Salmonella and Shigellae. J. Clin. Path., 29:598, 1958.

- 33-FARIA, M. F. G. Determinação quantitativa de alguns grupos de bactérias e isolamento de salmonelas a partir de amostras de fígado de bovino, vendido no município de São Paulo. São Paulo, 1982. (Tese de mestrado na Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo).
- 34-FRAZIER, W. C. Microbiología de los alimentos. 2^a. ed. Zaragoza, Ed. Acribia, 1976,
- 35-GALBRAITH, N. S. Studies of human Salmonellosis in relation to infection in animals. Vet. Rec., 73:1296-1303, 1961.
- 36-GALTON, M. M. et al. Salmonella in swine, cattle and the environment of abattoirs. J. infect. Dis., 95:236-245, 1954.
- 37-GANVILLE, L. et al., Destruction des salmonella au cours des opérations d'abattage des porcs importances de l'échaudage. Ann. Méd. Vet., 20:73-83, 1967.
- 38-GELDREICH, E. E. Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. In: BERG, G. Indicators of viruses in water and food. Ann. Arbor. Mich., Ann. Arbor. Science, 1978. p.51-79.
- 39-GELDREICH, E. E. & BORDNER, R. H. Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market: a review. J. Milk Food Technol., 34:184-195, 1971.
- 40-GELDREICH, E. E. & VAN DONSEL, D. J. Salmonellae in fresh water pollution. Cincinnati, Ohio, 1970. (Apresentado a National Specially Conference on Desinfection, Amherst, Mass., 1970).
- 41-GENIGEORGIS, C. Public health importance of Clostridium perfringens J. Am. Vet. Med. Assoc., 167:821-26, 1975.
- 42-GIORGI, W. Animais domésticos como portadores de Salmonelas: significado epidemiológico e sua relação com a saúde pública. São Paulo, 1972. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da USP).

- 43-HALL, H. E. & ANGELOTTI, R. Clostridium perfringens in meat and meat products. Appl. Microbiol., 13:352-357, 1965.
- 44-HALL, H. E. et al. Characteristics of Clostridium perfringens strains Associated with food and food - borne disease. J. Bact., 85: 1094-1103, 1963.
- 45-HAUSCHILD, A. H. W. Clostridium perfringens enterotoxin. J. Milk Food Technol., 34:596-599, 1971.
- 46-HAUSCHILD, A. H. W. Food poisoning by Clostridium perfringens. In: HURT, A. & MAN, J. M., ed. - Microbial food borne infections and intoxications. Ottawa, Health Protection Branch, 1973. p.64-68.
- 47-HOBBS, B. C. Clostridium welchii as food poisoning organism. J. appl. Bact., 28: 74-82, 1965.
- 48-HOBBS, B. C. & GILBERT, R. J. Food poisoning and food hygiene. 4 ed. London, Edward Arnold, 1978.
- 49-HOBBS, B. C. & GILBERT, R. J. Microbiological standards for food: public health aspects. Chem. Industr., 7:215-219, 1970.
- 50-HOBBS, B. et al. Clostridium welchii food poisoning. J. Hyg., Cambridge, 51:75-101, 1953.
- 51-HOFER, E. Avaliação de diferentes meios de enriquecimento para o isolamento de Salmonella ocorrentes em água de esgoto. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 70:299-308, 1972.
- 52-HOFER, E. & COSTA, G. Investigação sobre a ocorrência de Salmonella em esgotos sanitários da Cidade do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 70:221-236, 1972.
- 53-HORMAECHE, E. & SALSAMENDI, D. Sobre la presencia de salmonelas en los ganglios mesentéricos de cerdos normales. Arch. urug. Med., 9:665-672, 1936

- 54-IARIA, S. T. et al. Contaminação do quibe cru, vendido na zona central da cidade de São Paulo, por microorganismos de origem fecal. Arg. Fac. Hig. S. Paulo, 19:111-121, 1965.
- 55-INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS Factors affecting life and death of microorganisms. New York, Academic Press, 1980.
- 56-INTERNACIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS Micro-organisms in foods, their significance and methods of enumeration. 2 ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
- 57-JAY, J. M. Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acribia, 1973.
- 58-JENNINGS, W. E. Food-borne illness. In: LIBBY, J. A. Meat hygiene. 4^{ed}. Philadelphia, Lea & Febiger, 1975. p.261-95.
- 59-JONES, B. et al. Contamination of pig with scalding water studied with a radiolabel ed colloid. Fleischwirt., 59:1524-1526, 1979.
- 60-KAMPELMACHER, E. H. et al. Futher studies on Salmonellae in slaughter-house and in normal slaughter pig. Zentbl. Vet. Med., 10:1-27, 1963.
- 61-KAMPELMACHER, E. H. et al. Studies on Salmonella in slaughter-house. Zentbl. Vet. Med., 8:1025-1042, 1961.
- 62-KATSUBE, Y. et al. Salmonella carriers in swine. Japanese J. Vet. Science, 35:25-31, 1973.
- 63-KELLY, A. T. & FULTON, M. Use of triphenyl tetrazolium in motility test medium. Am. J. Clin. Pathol., 23:512-516, 1953.
- 64-KOTAKA, P. I. et al. Surto de toxi-infecção alimentar ocorrido em Curitiba-Paraná/1978. Bol. epidem., Rio de Janeiro, 11:49- 56, 1979.
- 65-LAWRIE, R. A. Ciencia de la carne. Zaragoza, ed. Acribia, 1967.

- 66-LEE, J. A. et al. Salmonellas on pig farms and in abattoirs. J. Hyg., Cambridge, 70:141-150, 1972.
- 67-LEIFSON, E. The fermentation of sodium malonate as a means of differentiating Aerobacter and Escherichia. J. Bact., 26: 329-330, 1933.
- 68-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. São Paulo. São Paulo, 1979. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).
- 69-LIBELT, K. Bacterial contamination and pollution of the scalding water used in the slaughtering of pig. Med. Veterin., 27:415-419, 1971.
- 70-LOPES, C. A. M. Contribuição ao estudo da flora bacteriana de sardinha (Sardinella aurita) e de pescada branca (Microdon ancylodon) São Paulo, 1972. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da USP).
- 71-MATCHES, J. R. & LISTON, J. Effects of incubation temperature on the salt tolerance of Salmonella. J. Milk Food Technol., 35:39-44, 1972.
- 72-McCLUNG, L. S. Human food poisoning due to growth of Clostridium perfringens (Welchii) in freshly cooked chickens preliminary note. J. Bact., 50:229-31, 1945.
- 73-McDONAGH, V. P. & SMITH, G. H. The significance of the abattoir in Salmonella infection in Bradford. J. Hyg., Cambridge, 56:271-279, 1958.
- 74-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Curitiba, Pr., Imprensa da Universidade, s.d.

- 75-MORENO, G. e al. Isolamento de enterobactérias a partir de produtos cárneos embutidos. Arq. Inst. Biol., São Paulo 36:191-196, 1969.
- 76-MOSSEL, D. A. et al. Bacteriological and quality perspectives of Salmonella radication of frozen boneless meats. Alimenta, 11:51-60, 1972.
- 77-MUCCIOLO, P. Temas de tecnologia e inspeção de carne. São Paulo, Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1974.
- 78-NAKAMURA, M. & SCHULZE, J. A. Clostridium perfringens food poisoning. Ann. Rev. Microbiol., 24:359-72, 1970.
- 79-NEIVA, C. Incidência de Salmonella em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 3., Rio Grande do Sul, 1946. Anais Porto Alegre, 1946. p.430-5.
- 80-NEIVA, C. et al. Sorotipos de salmonelas isoladas em Matadouros Frigoríficos I - Línfonodos mesentéricos, pré-escapulares e pré-crurais de suínos. Acta. Biol. Par., Curitiba, 6:57-65, 1977.
- 81-PANETTA, J. C. et al. Comportamento do paratolueno - cloro - sulfamido - sódico na descontaminação da água de escaldamento de suínos abatidos. Rev. Fac. Med. Vet. e Zoot. Univ. S. Paulo. 14:293-300, 1977.
- 82-PAULA, O. Salmonelas em carnes trituradas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA 79, Porto Alegre, 1976. Resumo dos trabalhos. Porto Alegre, Liefel Congressos e Empreendimentos Ltda, 1976. (p. AP09/12).
- 83-PERES, J. N. Investigação sobre o gênero Salmonella em Belo Horizonte. Belo Horizonte, 1948. (Tese).
- 84-PESO, O. A. Estudio de un método de concentración de muestras de agua para la investigación de bacterias. Rev. Administr. Nac. Agua, Buenos Aires, 115:54-62, 1947.

- 85-PESSÔA, G. V. A. & PEIXOTO, E. S. Caldo selenito-novobiocina; um meio de maior seletividade para o isolamento de Salmonella de fezes. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 31:1-3, 1971.
- 86-PESSÔA, G. V. A. et al. Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-1976. I - sorotipos de Salmonella isolados e identificados. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 38:87-105, 1978.
- 87-PESTANA, B. R. & RUGAI, E. Da presença de salmonelas nas carnes preparadas. Rev. Inst. Adolfo Lutz., 7:5-7, 1947.
- 88-PROST, E. & LIBELT, K. Variation in the bacterial contamination of carcasse and scalding water during the slaughter of pigs. Fleischwirt., 52:867-870, 1972.
- 89-PROST, E. & RIEMANN, H. Food borne salmonellosis. Ann. Rev. Microbiol., 21:495-538, 1967.
- 90-ROBBS, N. K. & ROBBS, P. G. Condições microbiológicas de produtos cárneos comercializados no Rio de Janeiro. Rev. Microbiol., São Paulo, 10:92-6, 1979.
- 91-ROBERTS, T. A. The effects of slaughter practices on the bacteriology of the red meat carcasse. Roy. Soc. Hlth J., 100:3-9, 1980.
- 92-RUBIN, H. L. et al. The occurrence of salmonella in the lymph glands of normal hogs. Amer. J. Hyg., 36:43-47, 1942.
- 93-SANDRI, C. J. P. Ocorrência de Salmonella em pastas embutidas (patê). (Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 8, Porto Alegre, R. G. do Sul, 1976).
- 94-SCOTT, W. M. Salmonellas in healthy pigs at slaughter. Proc. Royal Soc. Med., 33:33-36, 1940.
- 95-SERRANO, A. M. Incidência de Clostridium perfringens em alimentos um surto de intoxicação e evidenciação da prova de lecitinase. Campinas, S. P., 1976. (Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas).

- 96-SHOTTIS, E. et al. Further studies on Salmonella in human and animal foods and in the environment of food processing plants. In: ANNUAL MEETING U. S. LIVESTOCK SANITARY ASSOCIATION, 65., Minneapolis, Minn., 1962. Proceeding. Minneapolis, Minn., 1962.p.309-318.
- 97-SILVA-CAMPS, Y. Verificação das condições sanitárias de águas de escaldamento em matadouros de suínos através da determinação do NMP de bactérias coliformes totais e fecais e de estreptococos fecais. São Paulo, 1980. (Tese de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo).
- 98-SILVA, R. G. et al. An outbreak of food poisoning due to salmonella typhimurium in a general hospital. Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, 6:258-267, 1964.
- 99-SING, G. M. & KAURA, Y. K. Carrier state of salmonella infection in pigs and man and its public health importance. Indian Vet. J., 53:739-742, 1976.
- 100-SNIJDERS, J. M. Hygiene in the slaughter of pigs. I. Scalding. Fleischwirt., 55:836-840, 1975.
- 101-STRONG, D. H. et al. Incidence of Clostridium perfringens in american foods. Appl. Microbiol., 11:42-4, 1963.
- 102-SUTTER, U. L. et al. Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 2. ed. Los Angeles, School of Medicine UCLA, 1975.
- 103-SUTTON, R. G. A. Distribution of heat-resistant Clostridium welchii in rural areas in Australia. J. Hyg., Cambridge, 64: 65-74, 1966.
- 104-SUTTON, R. G. A. & HOBBS, B. C. Food poisoning caused by heat-sensitive Glostridium Welchii: a report of five recent outbreak. J. Hfg., Cambridge, 66:135-146, 1968.
- 105-TAUNAY, A. E. Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal sua importância e frequência no Município de S. Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 28:43-69, 1968.

- 106-TAYLOR; J. & MCCOY, J. H. Salmonella and Arizona infections. In: RIEMANN; H. Food borne infections and intoxications. New York, Academia Press, 1969. p.3-72.
- 107-THATCHER, F. S. & CLARK, D. S. Analisis microbiológico de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acríbia, 1973.
- 108-TODD, E. C. Foodborne disease in six countries: a comparison. J. Food Protec., 41:559-565, 1978.
- 109-WATSON, W. A. Salmonellosis and meat hygiene: red meat. Vet. Rec., 96:374-376, 1975
- 110-WILSON, W.J. & BLAIR, E. M. Use of a glucose bismuth sulphite iron medium for the isolation of B. typhosus and B. proteus. J.Hyg., 26:374-391, 1972.
- 111-YAMAGISHI, T. et al. Isolation of toxigenic strains of Clostridium perfringens from soil. J. Bact., 88:646-652, 1964.
- 112-YAMAGISHI, T. et al. Persistent high numbers of Clostridium perfringens in the intestine of Japanese aged adults. Jap. J. Microbiol., 20:397-403, 1976.
- 113-YASUKAWA, A. Studies on the distribution of Clostridium perfringens in living environments and on the enteropathogenesis of organisms. Excerpta med., Sect. 17, 30:68, 1978. (Resumo).
- 114-ZEBRAL, A. A. et al. Salmonella in lymph nodes of apparently normal pigs slaughtered at Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 72:223-236, 1974.