

SIMONE QUINTÃO SILVA

**EFEITO DE ÁCIDO E BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE
Salmonella enterica SOROVAR ENTERITIDIS EM CARNE SUÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586e
2006

Silva, Simone Quintão, 1976-

Efeito de ácido e baixas temperaturas sobre
Salmonella enterica sorovar Enteritidis em carne suína /
Simone Quintão Silva. – Viçosa : UFV, 2006.
xiv, 60f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Miriam Teresinha dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 43-57.

1. Salmonella - Efeito dos ácidos. 2. Salmonella -
Crescimento - Aspectos ambientais. 3. Carne de porco -
Microbiologia. 4. Alimentos de origem animal -
Contaminação. 5. Enterobactérias. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

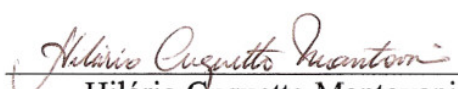
CDD 22.ed. 579.344

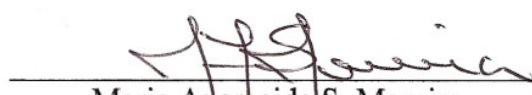
SIMONE QUINTÃO SILVA

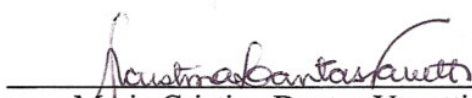
**EFEITO DE ÁCIDO E BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE
Salmonella enterica SOROVAR ENTERITIDIS EM CARNE SUÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

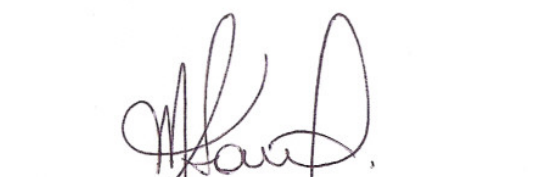
APROVADA: 19 de setembro de 2006.


Hilário Cuquetto Mantovani


Maria Aparecida S. Moreira


Maria Cristina Dantas Vanetti
(Co-orientadora)


Célia Alencar de Moraes
(Co-orientadora)


Miriam Teresinha dos Santos
(Orientadora)

Aos meus pais Antônio e Regina,
ao meu irmão Antônio José
e ao meu noivo Fernando,
dedico esta realização!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta realização.

Aos meus pais Antônio da Silva e Regina Maria Quintão Silva e ao meu irmão Antônio José da Silva, pelo incentivo, apoio e empenho para minha formação.

Ao meu noivo Fernando França da Cunha, pelo amor, carinho, amizade e ajuda durante todo este tempo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Míriam Teresinha dos Santos, pela orientação, dedicação, compreensão e ajuda durante toda minha caminhada.

Às professoras Célia Alencar de Moraes e Maria Cristina Dantas Vanetti, pela confiança, colaboração e conselhos aos quais sempre pude recorrer.

Aos professores Hilário Cuquetto Mantovani e Maria Aparecida S. Moreira, pelas sugestões e críticas que contribuíram para este trabalho.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, por terem participado da construção de meu saber.

A Lucimar Lopes, pela amizade e pelo incentivo.

A Simone Paes, pelo companheirismo e pela ajuda durante todo experimento.

Aos colegas dos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, Anaeróbios e Patógenos Alimentares, Adriana Leandro, Adriana Ponce, Ana Andréa, Bete, Eliane, Elizeth, Esther, Flávia, Maurílio, Néia e Renata, pela amizade e agradável convivência.

Aos meus familiares, pelo incentivo que sempre impulsionaram meu trabalho.

À Lucinéia e Graça, pelo apoio e pelas correções desta dissertação.

À Fundação André Tosello, pela doação da cultura de referência.

A todos os funcionários, pela dedicação e assistência durante este período.

Enfim, a todos que contribuíram ou torceram pelo sucesso deste trabalho.

BIOGRAFIA

SIMONE QUINTÃO SILVA, filha de Antônio da Silva e Regina Maria Quintão Silva, nasceu no dia 19 de maio de 1976, em Viçosa-MG.

Em 1998, ingressou no curso de Economia Doméstica, na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em maio de 2002.

Em março de 2004, iniciou, na mesma instituição, o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na área de Microbiologia de Alimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Salmonella</i> em carne suína	3
2.2. Respostas adaptativas aos estresses ácido e frio em bactérias	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Microrganismos	19
3.2. Padronização das culturas	19
3.3. Avaliação do efeito do pH baixo sobre o crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis em Caldo Trypticaseína e Soja (TSB)	20

	Página
3.4. Avaliação do efeito do pH baixo sobre a sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis em TSB	20
3.5. Preparo de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis submetidas a tratamentos ácidos	21
3.6. Avaliação da sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis em carne suína estocada sob temperaturas de refrigeração e congelamento	21
3.7. Avaliação da subsequente tolerância a ácido de <i>Salmonella</i> Enteritidis em Fluido Gástrico Simulado (FGS)	22
3.8. Delineamento estatístico	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Efeito do pH sobre o crescimento e a sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis	24
4.2. Viabilidade de <i>Salmonella</i> Enteritidis em carne suína e estocada sob temperatura de refrigeração	30
4.3. Sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis em carne suína e estocada sob temperatura de congelamento	32
4.4. Sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis em Fluido Gástrico Simulado (FGS)	35
5. RESUMO E CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	43
ANEXO	58

LISTA DE TABELAS

		Página
1	Velocidade específica de crescimento (μ) e densidade óptica máxima ($D.O_{\max}$) a 600 nm de <i>Salmonella</i> Enteritidis CCS3 e ATCC 13076, cultivadas em Caldo Trypticaseína e Soja (TSB) com pH ajustado entre 4,0 e 7,2, por 12 horas	27
2	Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) de <i>Salmonella</i> Enteritidis CCS3 e ATCC 13076 em Caldo Trypticaseína e Soja (TSB) a 37°C com pH ajustado entre 1,5 e 3,5	29
3	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 em Fluido Gástrico Simulado (FGS) após tratamento ácido prévio em pH 4,0; 4,5; 5,0 e 7,2, por uma hora e estocagem sob temperatura de refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, por sete dias	39
4	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 em Fluido Gástrico Simulado (FGS) após tratamento ácido prévio em pH 4,0; 4,5; 5,0 e 7,2, por uma hora e estocagem sob temperatura de congelamento a $-18 \pm 1^\circ\text{C}$, por 84 dias	39
1A	Análise de variância	60

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis CCS3 em Caldo Tripti- caseína e Soja (TSB) a 37°C com pH ajustado entre 3,5 e 7,2	25
2	Crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 em Caldo Trypticaseína e Soja (TSB) a 37°C com pH ajustado entre 4,0 e 7,2	26
3	Efeito de diferentes valores de pH sobre a velocidade específica de crescimento (μ) de <i>Salmonella</i> Enteritidis CCS3 e ATCC 13076 em TSB a 37°C	28
4	Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de <i>Salmonella</i> Enteritidis CCS3 inoculadas em carne suína mantida sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) por até sete dias .	30
5	Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 inocula- das em carne suína mantida sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) por até sete dias	31
6	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis CCS3 inoculada em carne suína mantida sob temperatura de congelamento ($-18 \pm1^\circ\text{C}$) por até 84 dias	33

7	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 inoculadas em carne suína mantida sob temperatura de congelamento ($-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$) por até 84 dias	33
8	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis CCS3 em Fluido Gástrico Simulado (FGS) após tratamento ácido prévio com diversos valores de pH por uma hora e estocagem sob refrigeração a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por sete dias	36
9	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis CCS3 em Fluido Gástrico Simulado (FGS) após tratamento ácido prévio com diversos valores de pH, por uma hora e estocagem sob temperatura de congelamento a $-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 84 dias	37
1A	Curva de calibração de <i>Salmonella</i>	59

RESUMO

SILVA, Simone Quintão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2006. **Efeito de ácido e baixas temperaturas sobre *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em carne suína.** Orientadora: Miriam Teresinha dos Santos. Co-orientadoras: Célia Alencar de Moraes e Maria Cristina Dantas Vanetti.

Considerando que a tolerância ao ácido é um importante fator de virulência relacionado à sobrevivência ao baixo pH da secreção gástrica em patógenos veiculados por alimentos e o expressivo aumento da prevalência de *Salmonella* sorovar Enteritidis nos últimos anos, como agente etiológico de salmonelose humana, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de ácido e da estocagem sob temperaturas baixas em *Salmonella* sorovar Enteritidis. O crescimento de *S. Enteritidis* CCS3, isolada de carcaça suína, e *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi determinado em Caldo Trypticaseína e Soja (TSB) com valores de pH que variaram de 3,5 a 7,2. A sobrevivência foi avaliada no mesmo meio com pH entre 1,5 e 3,5. A tolerância ao Fluido Gástrico Simulado (FGS) dessas bactérias previamente submetidas a tratamento ácido subletal em pH 4,0; 4,5 e 5,0 inoculadas em carne suína estocada por sete dias a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ e por 84 dias sob congelamento a $-18 \pm 1^\circ\text{C}$ foi também avaliada. *S. Enteritidis* CCS3 apresentou

valores maiores de velocidade específica de crescimento em TSB acidificado e sobreviveu por mais tempo em pH inferior a 3,5 do que *S. Enteritidis* ATCC 13076. A estocagem em carne suína por sete dias a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ não afetou as populações de *S. Enteritidis* investigadas. Após 84 dias de congelamento, as reduções médias das populações de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 foram de 0,8 e 1,5 ciclos logarítmicos, respectivamente. O tratamento ácido aplicado previamente não teve efeito sobre a sobrevivência das duas culturas sob baixas temperaturas. Após a estocagem sob temperaturas baixas, as células de *S. Enteritidis* CCS3 apresentaram tolerância à exposição ao FGS por até três horas. Contrariamente, células de *S. Enteritidis* ATCC 13076 perderam a culturabilidade após 10 minutos de desafio ao FGS. Células de *S. Enteritidis* CCS3 submetidas a tratamento ácido prévio em pH 4,0 mostraram-se mais tolerantes à exposição por 180 minutos ao FGS (redução de 15%) que células submetidas aos tratamentos ácidos em pH 4,5 e 5,0 e células do tratamento controle (sem tratamento ácido) com redução de 30% da população.

ABSTRACT

SILVA, Simone Quintão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September 2006. **Effect of acid and low temperatures on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in pork.** Adviser: Miriam Teresinha dos Santos. Co-Advisers: Célia Alencar de Moraes and Maria Cristina Dantas Vanetti.

Considering that the acid tolerance is an important virulence factor related to survival at low pH of gastric barrier of foodborne pathogens and the expressive increasing of prevalence of *Salmonella* serovar Enteritidis in recent years as etiologic agent of human salmonellosis, this work aimed to evaluate the effect of acid and storage under low temperatures on *Salmonella* serovar Enteritidis. The growth of *S. Enteritidis* CCS3 isolated of swine carcass and *S. Enteritidis* ATCC 13076 at Trypticasein and Soya Broth (TSB) with pH values between 3.5 and 7.2 and the survival in the same media with pH values between 1.5 and 3.5 were investigated. The tolerance to simulated gastric fluid (SGF) of these cells previously sublethal acid treatment pH 4.0, 4.5 and 5.0 inoculated in pork maintained storage by 7 days at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ and by 84 days at freezing temperature ($-18^\circ\text{C} \pm 1$) was also evaluated. *S. Enteritidis* CCS3 presented higher values of specific growth rate in acidified TSB and this culture had longer time survival in $\text{pH} < 3,5$ than *S. Enteritidis* ATCC 13076. The storage in pork by

seven days at $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ did not effect the populations of *S. Enteritidis* studied. After 84 days of cold storage, the media of population reductions of *S. Enteritidis* CCS3 and ATCC 13076 were 0.8 and 1.5 log cycle, respectively. The previous acid treatment did not enhance the survival of both cultures at low temperatures. After low temperature storage, the cells of *S. Enteritidis* CCS3 were tolerant until three hours SFG exposure. Instead, cells of *S. Enteritidis* ATCC 13076 lost culturability after 10 minutes of SFG challenge. *S. Enteritidis* CCS3 cells submitted to acid treatment at pH 4.0 showed are more tolerant to 180 minutes SFG exposure (15% of population reduction) than cells submitted to other acid treatments (pH 4.5 and 5.0) and cells of control (without acid treatment) with 30% of population reduction.

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é a mais consumida mundialmente, devido ao seu elevado valor nutritivo e atributos sensoriais. O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína. Para atender as exigências do mercado e evitar toxinfecções ocasionadas pelo consumo de produtos contaminados, o sistema de biossegurança, de qualidade e segurança alimentar vem sendo aprimorado.

O gênero *Salmonella* pode ser responsável por infecções veiculadas por alimentos de origem animal, incluindo carne suína, representando um risco à saúde pública.

Patógenos alimentares, incluindo *Salmonella*, são comumente expostos a condições de estresses subletais durante o processamento, armazenamento e consumo de alimentos, tais como temperaturas altas e baixas, estresses osmótico e ácido. Os microrganismos dispõem de mecanismos genéticos e fisiológicos, como a síntese de proteínas que protegem e reparam os danos causados por essas condições de estresse em suas estruturas. Essas proteínas podem ser específicas para determinados tipos de estresse ou podem ainda ter um efeito inespecífico, tornando o microrganismo mais tolerante a outros estresses, efeito que é denominado resistência cruzada.

Há muitos relatos sobre a resposta de tolerância a ácido (ATR), especialmente dos sorovares *S. Typhi* e *S. Typhimurium* submetidos a ambientes

ácidos moderados, na qual são expressas proteínas do choque ácido (ASPs) responsáveis por proteger esses microrganismos em ambientes ácidos extremos como o suco gástrico e a outros estresses, como altas temperaturas.

Aumento de casos de infecção em humanos a partir de 1960 por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis tem sido observado no mundo, sendo que desde 1990, esse é o sorovar mais freqüentemente isolado dentre os sorovares não-tifóides em surtos alimentares, superando *S. Typhimurium* como agente de salmoneloses.

Até o momento, não foram encontrados trabalhos sobre a tolerância ao ácido após estocagem sob baixas temperaturas em *S. Enteritidis*, o sorovar de maior prevalência no Brasil associado a surtos de infecção alimentar.

Com a finalidade de obter informações sobre *S. Enteritidis* foram investigados, neste trabalho, o comportamento e a sobrevivência de células submetidas previamente a tratamento ácido sob baixas temperaturas inoculadas em carne suína e subseqüente tolerância ao ácido após exposição ao Fluido Gástrico Simulado (FGS).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Salmonella* em carne suína

A contaminação microbiológica constitui a maior fonte de riscos na produção de alimentos de origem animal, uma vez que esses alimentos podem abrigar diversos microrganismos patogênicos. Dentre as bactérias freqüentemente veiculadas por esses alimentos, destacam-se *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium*.

O gênero *Salmonella* é responsável por febre tifóide, paratifóide e gastroenterites agudas e severas em humanos e, portanto, sua presença não é tolerada nos produtos alimentícios. Nos últimos anos, a taxonomia e a nomenclatura do gênero *Salmonella* têm se alterado, sendo que atualmente o gênero se encontra dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* baseado em hibridização DNA-DNA (CROSA et al., 1973; REEVES et al., 1989). A espécie *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *houtanae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *indica* e *S. enterica* subsp. *salamae* (LE MINOR; POPOFF, 1987; POPOFF et al., 2004). Para abreviar as citações, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium, por exemplo, tem

sido reduzida para *Salmonella* sorovar Typhimurium ou ainda *Salmonella* Typhimurium (BRENNER et al., 2000).

Os sorovares pertencentes à *S. enterica* subsp. *enterica* são designadas por um nome geralmente relacionado a uma região geográfica onde este sorovar foi primeiramente isolado. Os sorovares pertencentes às outras subespécies são designados por sua fórmula antigênica, escrita em seguida ao nome da subespécie em questão. As fórmulas antigênicas simplificadas para os sorovares de *Salmonella* estão definidas no documento denominado *Kauffmann-White scheme*, no qual também os novos sorovares são listados em atualizações anuais (POPOFF; LE MINOR, 2001; POPOFF et al., 2001; POPOFF et al., 2003; POPOFF et al., 2004). Antes de 1987, os sorovares de *Salmonella* eram grafados em itálico, caracterizando diferentes espécies, como por exemplo, *S. typhi*, *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. Cabe ressaltar que, segundo a *Comission of the International Commíttee on the Systematics of Prokaryotes* (POPOFF et al., 2004; TINDALL et al., 2005), a designação dos sorovares deve ser feita em letras romanas com a primeira em maiúscula e não em itálico. No entanto, ainda hoje, vários autores utilizam o nome do sorovar em itálico, contrariando a recomendação dessa comissão. Neste trabalho, será empregada a nomenclatura segundo as recomendações mais recentes para a designação dos sorovares utilizados nessa pesquisa e nos trabalhos científicos citados na revisão bibliográfica e discussão dos resultados.

Os sorovares tipicamente envolvidos em salmoneloses de mamíferos, incluindo humanos, quase invariavelmente pertencem à subespécie *enterica* (LE MINOR; POPOFF, 1987; BRENNER et al., 2000; TINDALL et al., 2005; HEYNDRICKX et al., 2005).

Existem aproximadamente 2.600 sorovares de *Salmonella*, destes *S. Typhi* e *S. Paratyphi* causam síndromes sistêmicas graves (febre tifóide e paratifóide) e os demais sorovares não-tifóides podem causar gastroenterites de gravidade variável em humanos e animais (ALTEKRUSE et al., 1997). Estima-se que ocorram, aproximadamente, 1,4 milhões de casos de infecção por *Salmonella*, 31.000 hospitalizações e 1.100 mortes a cada ano nos Estados

Unidos (MEAD et al., 1999; VOETSCH et al., 2004) com custo, aproximado de dois bilhões de dólares (FRENZEN et al., 1999). Ainda nos Estados Unidos, em levantamento epidemiológico recente, constatou-se que 17,7% dos casos de hospitalização por gastroenterites foram devido a infecções por *Salmonella enterica* contra 10,8% devido a espécies de *Campylobacter* e o período de internação devido a complicações decorrentes de gastroenterites por *Salmonella* foi mais que o dobro do necessário para complicações devido a infecções por *Campylobacter* (HELMS et al., 2006).

A dose infecciosa de *Salmonella* para voluntários saudáveis foi estimada em, aproximadamente, um milhão de células por grama. Entretanto, em alguns surtos associados a alimentos sólidos, envolvendo este patógeno, a dose infecciosa foi inferior a 10^2 células. Esses alimentos oferecem uma superfície para a fixação do patógeno tornando-o menos susceptível às defesas do organismo hospedeiro, como o pH baixo do suco gástrico. Portanto, a dose infecciosa de um agente patogênico entérico depende, entre outros fatores, de sua capacidade para resistir a esse pH (GAWANDE; BHAGWAT, 2002). Sorovares de *Salmonella* expostos a pH 2,5 sobreviveram melhor quando foram inoculados em alimentos protéicos como bife de boi ou ovos, o que permite sugerir que a composição química do alimento pode favorecer a passagem de bactérias patogênicas pelo trato gastrointestinal (WATERMAN; SMALL, 1998).

Os microrganismos patogênicos apresentam fatores de virulência que são essenciais para superar as defesas do corpo humano. O gênero *Salmonella* apresenta vários fatores de virulência como a presença de cápsula e fimbrias responsáveis pela fixação; flagelos que permitem sua translocação; capacidade de produção de sideróforos que captam ferro, essencial para sua multiplicação; produção de enzimas e outros fatores que permitem a invasão celular e a produção de toxinas. Em *Salmonella*, os genes responsáveis por esses fatores se encontram em regiões classificadas como ilhas de patogenicidade. Os produtos dos genes das ilhas de patogenicidade 1 e 2 são fundamentais para a invasão das células do epitélio e para a multiplicação intracelular, respectivamente (OHL; MILLER, 2001).

Salmonella Typhimurium tem sido considerado o mais importante entre os sorovares relacionados aos surtos de infecção alimentar por salmonelas. Sorovares resistentes a vários antibióticos estão frequentemente envolvidos nesses surtos, como é o caso de *S. Typhimurium* DT104 resistente a pelo menos cinco antibióticos (BESSER et al., 2000).

No entanto, nas últimas décadas, tem se observado um aumento expressivo na prevalência de *S. Enteritidis* tanto nos isolamentos a partir de espécimes clínicos quanto de alimentos (ALTEKRUSE et al., 1997; BÄUMLER et al., 2000). Nos Estados Unidos, a proporção do isolamento de *S. Enteritidis* entre todos os sorovares de *Salmonella* aumentou de 6% em 1980 para 25% em 1995 (ALTEKRUSE et al., 1997; MILLER; PEGUES, 2000). *S. Enteritidis* foi o sorovar mais freqüente nos Estados Unidos em 1994, representando 26% de todos os isolados de *Salmonella* (PATRICK et al., 2004). *S. Enteritidis* foi o terceiro sorovar (8,6%) mais isolado a partir de fontes humanas, depois de *S. Typhimurium* e *S. Hadar* no Canadá entre 1983 e 1992 e apenas o oitavo sorovar mais isolado de fontes não humanas (KHAKHRIA et al., 1997). Khakhria et al. (1997) observaram aumento nos isolamentos clínicos de *S. Enteritidis* nesse período de 10 anos de estudos no Canadá.

O aumento da prevalência de *S. Enteritidis* também tem sido observado desde 1960 na Europa (KAPPERUD et al., 1998; BÄUMLER et al., 2000). Na Noruega, a porcentagem de casos de salmonelose atribuídos a *S. Enteritidis* teve média anual de 51,4% comparada a 18,2% de *S. Typhimurium* (KAPPERUD et al., 1998). Uma análise retrospectiva realizada na Bélgica, entre 1973 e 1992, mostrou uma mudança na epidemiologia com a prevalência de *S. Enteritidis* (43,8%) predominando sobre *S. Typhimurium* (32,1%) (LE BACQ et al., 1994).

No Brasil, dentre as doenças causadas pela ingestão de alimentos, entre 1999 e 2002, foram notificados 176 surtos por *Salmonella* sp. (SILVA et al., 2005). Entre os sorovares mais freqüentemente isolados em episódios de infecção alimentar em humanos no Brasil encontram-se *S. enterica* Enteritidis, Typhimurium, Bredeney e Tennessee (LANDGRAF et al., 1985; CAUDURO et al., 1986; ESPER et al., 1998; DIAS et al., 1999; JAKABI et al., 1999).

No Brasil e, particularmente no estado de São Paulo, o isolamento clínico de *S. Enteritidis* apresentou aumento significativo e expressivo entre 1985 e 1999 (CASTRO et al., 2002) o que também havia sido observado por Tavechio et al. (1996), passando a ser o sorovar predominante, correspondendo a 64,9% dos isolamentos de material biológico de origem humana e 40,6% de outras origens em 1995.

Nos Estados Unidos, dados epidemiológicos indicam que *S. Enteritidis* ocupou o nicho ecológico em aves após a erradicação de *S. Gallinarum* (BÄUMLER, 2000).

Rabsch et al. (2000) testaram esta hipótese baseados em pesquisas epidemiológicas e demonstraram que o número de casos de *S. Enteritidis* em humanos é inversamente proporcional à prevalência de *S. Gallinarum* em aves.

Salmonella Enteritidis é de origem aviária, sendo encontrada principalmente em ovos. *S. Enteritidis* é transmitida aos ovos por duas vias, a transmissão vertical transovariana e a transmissão horizontal pela casca. Na primeira via, *S. Enteritidis* é introduzido no ovo a partir de ovários e ovidutos infectados antes da postura (THIAGARAJAN et al., 1994). *S. Enteritidis* pode também penetrar a casca de ovos, sendo esta rota considerada uma via secundária de contaminação, decorrente da contaminação da casca de ovos com fezes (MIYAMOTO et al., 1998; COX et al., 2000). *S. Enteritidis* é comumente isolada em casca de ovos e em carnes de frango e outras aves. Nos Estados Unidos, vários estudos têm demonstrado que aproximadamente 80% dos surtos por *S. Enteritidis* estão associados ao consumo de ovos ou alimentos contendo ovos (ST. LOUIS et al., 1988; MISHU et al., 1994; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, 2006). No entanto, este sorovar e outros sorovares de *Salmonella* podem ser isolados também de outros alimentos incluindo a carne de porco (BERENDS et al., 1997; KAPPERUD et al., 1998; PATRICK et al., 2004).

Investigações sobre surtos de salmonelose em humanos e as fontes de tal enfermidade destacam a carne suína como uma fonte importante e frequente deste patógeno (BORCH et al., 1996; BERENDS et al., 1997; ESCARTÍN et al.,

2000; DUFFY et al., 2001; LO FO WONG et al., 2002; VAN DER GAAG et al., 2004).

A ocorrência de vários patógenos na cadeia produtiva de suínos, incluindo *Salmonella*, constitui um risco importante para os consumidores e, por consequência, uma preocupação para as indústrias de processamento. Na Holanda, a média de incidência de salmonelose é de 100.000 casos por ano, sendo que 15% destes estão associados ao consumo de carne suína (BERENDS et al., 1997). Nos Estados Unidos, a prevalência de *Salmonella* nas amostras de carne suína é, em média, de 16,3% (ZHAO et al., 2001). Na Itália, Giovannini et al. (2004) evidenciaram a presença de *Salmonella* em 5% das amostras de carne suína avaliadas.

A contaminação das carcaças de suínos por *Salmonella* está relacionada a vários procedimentos adotados nas linhas de abate. Existe uma forte correlação entre os animais que apresentam *Salmonella* em suas fezes com o número de carcaças contaminadas ao final do abate (ALBAN; STÄRK, 2005). Tamplin et al. (2001) constataram a ocorrência de *Salmonella* em 33% das amostras de fezes de suínos analisadas nos Estados Unidos. Neste mesmo trabalho, aproximadamente 70% de carcaças contaminadas com *Salmonella* são originadas de animais portadores da bactéria na microbiota intestinal, enquanto a contaminação do restante das carcaças é decorrente de contaminação cruzada (TAMPLIN et al., 2001). Estima-se que de 5 a 30% de carcaças suínas produzidas na Holanda contenham *Salmonella* (BERENDS et al., 1997). *Salmonella* foi encontrada em 37% das carcaças suínas na Bélgica, sendo *S. Typhimurium* o sorovar mais prevalente (BOTTELDOORN et al., 2003). Esses mesmos autores estimaram que 29% das carcaças positivas para *Salmonella* eram decorrentes de contaminação cruzada ao longo da linha de abate (BOTTELDOORN et al., 2003). A prevalência de *Salmonella* em 31% das carcaças imediatamente após a sangria, 7% após evisceração e em 1% após o escaldamento foi constatada na Irlanda (PEARCE et al., 2004).

No Brasil, *Salmonella* foi detectada em 34,8% das amostras de amídalas e linfonodos mesentéricos de suínos em abatedouros do Rio de Janeiro

(LÁZARO et al., 1997). Em amostras de fezes e linfonodos de três frigoríficos do estado do Rio Grande do Sul, encontrou-se a prevalência de 55,7% de *Salmonella* sp., sendo 17,6% dos isolamentos a partir de linfonodos; 18,3% das fezes e 19,6% de ambos os materiais (BESSA et al., 2004). Os sorovares mais prevalentes nesse estudo foram *S. Typhimurium* (24,3%) e *S. Agona* (19,9%). Segundo Lima et al. (2004), *Salmonella* foi encontrada em 11,7% das superfícies de carcaças suínas em frigorífico no estado de Minas Gerais e estes autores sugerem que a contaminação por enterobactérias de carcaças suínas no Brasil, está relacionada principalmente à sanitização inadequada dos equipamentos e possíveis falhas durante a evisceração.

A preocupação com a qualidade microbiológica da carne suína justifica-se, pois, atualmente, esse tipo de carne lidera o consumo mundial de proteína animal. Seu consumo representa 44% do total de carnes produzidas e possui um grande potencial de mercado. Do ponto de vista nutricional, a carne suína é excelente fonte de proteínas de alto valor biológico, com o conteúdo de aminoácidos muito próximo ao da necessidade humana. É também importante fonte de nutrientes inorgânicos de alta biodisponibilidade como zinco, cobre, selênio e ferro e de vitaminas do complexo B, principalmente riboflavina, tiamina e niacina (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS – ABCS, 2006).

A suinocultura brasileira apresentou, nos anos 80 e 90, considerável evolução técnica, acompanhando as transformações do setor no mundo, passando de uma atividade complementar nas pequenas propriedades familiares para uma atividade industrial e empresarial. A necessidade de obter um produto seguro e com características sensoriais aceitáveis é fundamental para garantir a qualidade e se adequar aos pré-requisitos dos consumidores e dos países importadores. A indústria frigorífica trabalha para atender as constantes mudanças no perfil do consumidor, cada vez mais exigente por produtos de suínos com maior proporção de carne, menor deposição de gordura e de qualidades nutricional e sanitária garantidas. O setor produtivo tem se adaptado com agilidade às principais exigências do mercado com relação à qualidade nutricional e segurança

alimentar; bem-estar e sanidade animal; rastreabilidade e certificação; sustentabilidade econômica, social e ambiental da produção (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2002).

O Brasil, diferente dos países desenvolvidos, ainda apresenta um baixo consumo de carne suína por habitante, média de 11,1 kg/ano, valor quase sete vezes inferior ao da Dinamarca, que apresenta um consumo anual de 77,2 kg/habitante (ABCS, 2006).

As exportações brasileiras de carne suína somaram, no primeiro semestre de 2005, receita de US\$ 553 milhões, o que corresponde a um incremento de 82% na comparação com janeiro-junho do ano de 2004. Os volumes embarcados chegaram a quase 292 mil toneladas, com um crescimento de 30,5% na mesma comparação (ABIPECS EM FOCO, 2005).

Apesar da melhoria na qualidade nutricional e dos aumentos de produção, consumo e exportação da carne suína no Brasil e no mundo, esse produto ainda precisa de um acompanhamento da qualidade microbiológica, principalmente como possível veículo de *Salmonella*. Muitos países vêm desenvolvendo sistemas de controle de *Salmonella*, desde as granjas até os produtos de suínos disponíveis nas prateleiras dos estabelecimentos comerciais.

Têm-se concentrado muitos esforços na compreensão dos mecanismos de respostas a condições de estresse, às quais as bactérias patogênicas podem estar submetidas nas cadeias produtivas de alimentos. Além disso, têm-se investigado também, se mudanças de tecnologias de processamento, de hábitos alimentares de consumidores e as novas possibilidades advindas com a globalização dos mercados podem resultar na seleção de patógenos emergentes ou mesmo de patógenos mais resistentes a essas condições de estresse.

2.2. Respostas adaptativas aos estresses ácido e frio em bactérias

Os microrganismos, quando presentes nos alimentos ou no ambiente, estão geralmente expostos às condições de estresse, no entanto, esses microrganismos têm a capacidade de responder a essas condições adversas. Essa

resposta varia principalmente com o tipo e intensidade do estresse e o estado fisiológico do microrganismo (LOU; YOUSEF, 1997). Os microrganismos podem passar por processos de adaptação, tolerância ou injúria em relação ao estresse.

A adaptação ocorre quando células submetidas a um determinado estresse emitem resposta protetora para essa condição e algumas vezes podem aumentar a sua tolerância para diferentes tipos de estresse. As células tolerantes são as que sobrevivem ao estresse e cada microrganismo tem uma tolerância inerente para cada estresse em particular (YOUSEF; COURTNEY, 2002). As células injuriadas são as que, expostas a alguma condição de estresse, sofrem danos em seus componentes celulares e esses podem impedir a sua multiplicação (YOUSEF; COURTNEY, 2002).

Os microrganismos apresentam respostas moleculares programadas pelas quais proteínas induzidas por estresse são sintetizadas como estratégia de sobrevivência sob condições de estresse (FOSTER, 1999; DODD; ALDSWORTH, 2002; KOUTSOMANIS; SOFOS, 2004; BEALES, 2004).

Além das respostas específicas ao estresse, os microrganismos apresentam resposta geral ao estresse. Esse sistema ocorre quando as células estão com sua taxa de crescimento reduzida ou entram na fase estacionária e um grupo de genes é induzido por um fator sigma alternativo, RpoS (σ^{38}), o qual direciona a RNA polimerase para o seu promotor. A atividade do RpoS é conhecida por conferir resistência a diversos estresses, como altas temperaturas, radiação, luz UV, pH baixo, etanol, osmolaridade e provavelmente outros, ainda não identificados. Essa resposta geral induz várias mudanças fisiológicas, como resistência múltipla a estresse, mudança na composição do envelope celular e alterações na morfologia, por exemplo, células de *E. coli* transformam-se em pequenos cocos. Assim, RpoS é considerado o principal regulador na resposta geral ao estresse em bactérias (HENGGE-ARONIS, 2002; FOSTER, 2005).

Os patógenos alimentares são submetidos a vários estresses durante produção, preparo, estocagem e consumo dos alimentos.

No hospedeiro, os microrganismos patogênicos são expostos ao pH baixo do suco gástrico e os sobreviventes irão encontrar os ácidos orgânicos voláteis, bile e baixa concentração de oxigênio no intestino delgado. Dentre os desafios encontrados no hospedeiro deve-se considerar, ainda, a competição com a microbiota intestinal, que nesse estágio é intensa. Assim, somente os patógenos que conseguirem sobreviver a todos esses estresses irão colonizar ou invadir as células do epitélio intestinal e, portanto, causar doença (GAHAN; HILL, 1999).

O pH baixo do suco gástrico é um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra os microrganismos ingeridos por meio de alimentos. Quando a secreção gástrica é deficiente, há um aumento na susceptibilidade do hospedeiro a várias bactérias patogênicas (AUDIA et al., 2001; MARTINSEN et al., 2005).

Resistência ao pH baixo pode permitir que patógenos sobrevivam em alimentos ácidos e, conseqüentemente, à exposição ao ácido no estômago (BOOTH et al., 2002; MARTINSEN et al., 2005). Samelis et al. (2003) destacam a maior tolerância ao ácido em *S. Typhimurium* DT 104 em alimentos que contêm glicose e outros açúcares que podem ser fermentados e assim proporcionar uma adaptação gradual à condição ácida. A adaptação de células de *E. coli* O157:H7 ao estresse ácido pode diminuir a eficiência da aspersão com soluções de ácidos orgânicos sobre carcaças, visando a redução da contaminação superficial em ambientes de abate (BERRY; CUTTER, 2000; HUFFMAN, 2002). Para causar doença, *Salmonella* deve sobreviver ao pH baixo da secreção gástrica e, após passagem para o intestino, deve aderir e invadir o epitélio intestinal e, ou, as placas de Peyer (D'AOUST, 1997).

Microrganismos neutrófilos como *E. coli*, *S. Typhimurium* e *Shigella flexneri*, enquanto estão de passagem pelo trato gastrointestinal, podem suportar o baixo pH do suco gástrico, bem como os ácidos orgânicos voláteis presentes no intestino (BEARSON et al., 1997). Esse comportamento ocorre principalmente devido a uma reação do microrganismo na presença do ácido, que é chamada de Resposta de Tolerância a Ácido (ATR). Esta resposta tem sido bem caracterizada em *E. coli* e *S. Typhimurium*, nas quais tem sido demonstrada que a exposição a

pH sub-letal induz à expressão de várias proteínas do choque ácido – ASPs (“acid-shock proteins”) responsáveis por reparar danos nas macromoléculas das células decorrentes da exposição ao ácido e promover a sobrevivência bacteriana em subseqüentes ambientes acídicos extremos (FOSTER; HALL, 1990; FOSTER; HALL, 1991; LEYER; JOHNSON, 1992; LEYER; JOHNSON, 1993; FOSTER, 1993; LEYER et al., 1995; ARNOLD; KASPAR, 1995; BEARSON et al., 1997; RYU; BEUCHAT, 1998; GAHAN; HILL, 1999; CASTANIE-CORNET et al., 1999; FOSTER, 2001).

A ATR de *S. Typhimurium* é um sistema complexo de resposta que capacita a célula a sobreviver em ambientes ácidos como pH 3,0. Análise do proteoma por eletroforese bidimensional revelou que 60 proteínas do choque ácido são sintetizadas durante a fase log de crescimento enquanto que 45 são sintetizadas durante a fase estacionária (FOSTER, 2001). A ATR que ocorre na fase log em *Salmonella* possui dois estágios, pré-choque ácido e pós-choque ácido. O pré-choque ácido é um sistema de emergência para manter a homeostase celular no qual enzimas do tipo aminoácido-descarboxilase são induzidas para consumir prótons no meio intracelular. Em *Salmonella*, aminoácidos como lisina e arginina são importantes para manter o pH_{in} durante o choque ácido. A lisina descarboxilase (CadA) trabalha em cooperação com o antiporte de lisina/cadaverina (CadB). Neste processo, CadA descarboxila a lisina intracelular para cadaverina com consumo de um próton (PARK et al., 1996; ABEE; WOUTERS, 1999; JONGE et al., 2003). O pós-choque ácido é controlado por *rpoS* e inclui a síntese de proteínas que reparam e protegem as macromoléculas celulares (BEARSON et al., 1997).

A sobrevivência ao choque ácido em pH 3,3 de células de *S. Typhimurium* submetidas previamente a tratamento ácido pH 5,5 foi melhor do que células não adaptadas (TIWARI et al., 2004). Esses autores constataram maior resistência ácida do sorovar *S. Typhimurium* se comparado ao sorovar *S. Typhi*. Mostraram também que a estocagem de *S. Typhimurium* em caldo nutriente com pH 4,5 a 4°C prolonga o tempo de exposição a condições ácidas

extremas se comparada às de culturas estocadas em pH 7,3 na mesma temperatura (TIWARI et al., 2004).

Foram identificadas quatro proteínas que regulam a indução das ASPs em *Salmonella*. A ATR da fase log é regulada por Fur, proteína reguladora da captação de ferro, pelo sistema de dois componentes PhoP/Q e por um fator sigma alternativo, σ^S (FOSTER; HALL, 1992; HALL; FOSTER, 1996; BAIK et al., 1996; BEARSON et al., 1998; FOSTER, 1999; FOSTER; MORENO, 1999). A mutação de alguns desses genes reguladores previne a tolerância ao ácido na fase log, mas pouco interfere na tolerância a ácido na fase estacionária. A ATR da fase estacionária é regulada, em parte, por um regulador de resposta clássico o OmpR (FOSTER; HALL, 1990; FOSTER; HALL, 1991; BANG et al., 2000; BANG et al., 2002; BEARSON et al., 2006).

Arvizu-Medrano e Escartín (2005) compararam a sobrevivência e o crescimento de células dos sorovares *S. Typhi* e *S. Typhimurium* previamente adaptadas ou não em caldo TSB pH 5,5 por uma hora a 35°C em meio TSB acidificado com ácidos clorídrico, cítrico e láctico e comprovaram o efeito protetor da adaptação ácida. Nesse trabalho, constatou-se a diferença da população de sobreviventes em pH 3,0 das células adaptadas da ordem de dois ciclos logarítmicos. Observou-se, ainda, a diminuição da duração da fase lag quando o pH de crescimento era igual a 4,5 e a diferença entre os sorovares, sendo que o sorovar *S. Typhimurium* apresentou maior tolerância ao ácido que *S. Typhi* (ARVIZU-MEDRANO; ESCARTÍN, 2005).

Outra condição de estresse, além da exposição ao ácido, à qual freqüentemente *Salmonella* é submetida em alimentos é a temperatura baixa empregada, especialmente na estocagem de carnes.

A adaptação e sobrevivência dos microrganismos ao frio são relevantes devido ao aumento da produção de alimentos congelados e resfriados e da popularidade de alimentos minimamente processados com pouco ou nenhum conservante. Compreender como os microrganismos deterioradores e patogênicos respondem ao estresse causado pelas baixas temperaturas é

fundamental para definir as estratégias para uma conservação efetiva dos alimentos.

Alterações fisiológicas em resposta ao choque frio incluem a síntese de proteínas, que são especializadas em proteger os microrganismos dos efeitos deletérios. Essas proteínas são classificadas em CSPs (“cold-shock proteins”) e CAPs (“cold-shock acclimation proteins”). Ambos os grupos de proteínas são rapidamente expressos em resposta ao frio. No entanto, somente as Caps continuam sendo expressas durante o crescimento após a queda de temperatura (PANOFF et al., 1998; PHADTARE et al., 1999).

As principais consequências do choque frio são o bloqueio da síntese protéica, o rompimento da estrutura dos ribossomos e a formação de estruturas secundárias. As principais funções das CSPs são estabilizar a interação do mRNA com a subunidade 30 S do ribossomo, estabilizar a interação proteína-proteína e proteína-rRNA com o ribossomo e manter o formato linear do mRNA (RUSSELL, 2002). Além disso, com a queda de temperatura, ocorre uma diminuição na fluidez da membrana da bactéria, afetando as suas funções e os microrganismos reagem a essa condição aumentando a proporção de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados dos fosfolipídios de membrana para garantir maior fluidez (PHADTARE et al., 1999).

A sensibilidade das bactérias em relação ao frio é dependente de uma série de fatores, incluindo a temperatura empregada, meio de cultura, estirpe bacteriana, tipo de alimento e tempo de estocagem (BEALES, 2004).

A resposta ao choque frio tem sido identificada em bactérias mesófilas e psicrótróficas, principalmente aquelas que deterioram os alimentos como *Pseudomonas fluorescens*, *P. fragi* e bactérias lácticas ou patogênicas como *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, entre outras (RUSSEL, 2002).

O gênero *Salmonella* é conhecido por sua tolerância ao congelamento, assim, a conservação de carnes sob baixas temperaturas pode permitir a sobrevivência dessa bactéria (ARCHER, 2004). Foi demonstrada a sobrevivência de *Salmonella* por mais de 10 semanas em carne bovina moída e em embutidos

congelados a -18°C (BARREL, 1988). Uma mistura para sorvete pasteurizada foi responsável por um surto de salmonelose nos Estados Unidos, devido ao fato de ter sido transportada em câmara fria contaminada com *S. Enteritidis* (HENNESSY et al., 1996). Acredita-se que o processo inadequado de sanitização da câmara fria levou a contaminação do sorvete e como o processo de congelamento não inativou a *Salmonella*, ocorreu a disseminação por toda a região e mais de 224 mil pessoas foram acometidas.

Seis estirpes de *Salmonella* isoladas a partir de carcaças e fezes de suínos foram avaliadas quanto à sobrevivência em carne suína mantida sob temperatura de -15°C e as contagens tiveram redução média de 1,4 ciclos logarítmicos, após 20 semanas de estocagem (MENDES, 2005).

A resposta ao estresse nem sempre é específica, o que permite ao microrganismo exposto a condições subletais ser mais tolerante a outros estresses. Esse fenômeno é conhecido como resistência cruzada (FLETCHER; CSONKA, 1998; LEISTNER, 2000; BEALES, 2004). Por exemplo, quando *S. Typhimurium* é adaptada a condições ácidas moderadas, se torna mais tolerante a outros estresses, tais como altas temperaturas, sal, cristal violeta e polimixina B (LEYER; JOHNSON, 1993; KOUTSOMANIS; SOFOS, 2004). *Salmonella* foi mais tolerante a temperaturas elevadas após ter sido previamente adaptada à atividade de água (a_w) baixa (MATTICK et al., 2000; MATTICK et al., 2001). As células de *S. Typhimurium* adaptadas a pH 5,8 foram mais tolerantes a temperaturas de 45°C e 50°C , a pH 4,0 acidificado com ácido acético e lático e à concentração de 8% de NaCl (TOSUN; GÖNÜL, 2003). A resistência térmica de diferentes sorovares de *Salmonella* em carne suína contendo aditivos de cura foi avaliada por Quintavalla et al. (2001), que encontraram maior resistência ao calor pelo sorovar *S. Potsdam*, se comparada à resistência em meio de cultura TSB. Células de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 adaptadas ao ácido em sucos de fruta foram mais resistentes termicamente que células não adaptadas (SHARMA et al., 2005). Células de *S. Typhimurium* adaptadas ao ácido sobreviveram melhor em queijos (pH 5,2) e durante a fermentação ativa do leite (pH 4,2) do que as células não adaptadas (LEYER; JOHNSON, 1992). Resistência cruzada ao estresse

osmótico por NaCl e KCl foi observada em células de *S. Typhimurium* com ATR induzida por ácido acético e não por ácido láctico (GREENACRE; BROCKLEHURST, 2006).

Células de *Salmonella*, previamente submetidas à adaptação ácida após crescimento por 18 horas em meio TSB contendo 1,0% de glicose, apresentaram maior resistência térmica quando tratadas em temperaturas de 55 a 61°C em água peptonada tamponada (BACON et al., 2003a). A resistência a condições ácidas mais extremas (pH 3,0 por quatro horas) também foi alcançada por células de *Salmonella* adaptadas a ácido (BACON et al., 2003b).

A adaptação ácida em meio TSB contendo 1,0% de glicose de estirpes DT104 e não DT104 do sorovar *S. Typhimurium* resultou em maior sobrevivência após exposição ao FGS a pH 2 por três horas se comparada a células não adaptadas (FRATAMICO, 2003). No entanto, essa adaptação ácida não promoveu aumento da capacidade de invasão e sobrevivência em células de mamíferos (macrófagos e enterócitos) *in vitro* e não resultou em células mais resistentes à concentração de 2,6 M de NaCl, 150 mM de H₂O₂ e 170 mM de ácido acético de ambas as estirpes (FRATAMICO, 2003).

Vários trabalhos relatam a resposta de tolerância ao ácido, após inoculação de patógenos bacterianos em alimentos com diferentes valores de pH (WATERMAN; SMALL, 1998; ROERING et al., 1999; PRICE et al., 2004; STOPFORTH et al., 2005; TAMPLIN, 2005).

Uma condição que pode levar a tolerância ao ácido ocorre nos tratamentos de descontaminação de carcaças suínas por meio de aspersão de soluções ácidas. Uma população de 10² UFC/cm² de *S. Typhimurium* foi eliminada de carcaças suínas após aplicação de solução de ácido láctico a 2% e 5% por 120 e 60 segundos, respectivamente (NETTEN et al., 1995). Células de *E. coli* O157:H7 adaptadas ao ácido foram mais resistentes durante a aspersão com soluções de ácidos orgânicos sobre carcaças bovinas (BERRY; CUTTER, 2000). Por outro lado, a combinação de mecanismos como aplicação de vapor seguido de aspersão com solução de ácido láctico em superfícies de carcaças suínas foi eficiente na redução de microrganismos mesófilos e psicrotróficos

durante estocagem sob refrigeração no período de cinco dias (PIPEK et al., 2006).

Para reduzir o risco de doenças de origem alimentar e para conservar os alimentos, em muitos produtos é empregada a denominada tecnologia de barreiras, isto é, uma combinação de dois ou mais fatores antimicrobianos, cujos efeitos inibitórios somados podem ser maiores que os efeitos dos fatores isolados. Entretanto, observa-se que tal combinação de agentes nem sempre é mais inibitória para os patógenos alimentares. A tecnologia de barreiras pode representar a exposição dos microrganismos a estresses múltiplos durante a produção, preparo e estocagem em alimentos e a conseqüente seleção de microrganismos mais resistentes a essas ou outras condições de estresse (LEISTNER, 2000).

Foi demonstrado que a combinação de NaCl e pH baixo é menos efetiva do que o pH baixo isoladamente na redução do número de *E. coli* O157:H45 sugerindo que essa bactéria pode usar NaCl para contrabalançar a acidificação do seu citoplasma por ácidos orgânicos (CASEY; CONDON, 2002). Além disso, estes autores verificaram que combinações de agentes antimicrobianos nem sempre resultam em efeitos antimicrobianos aditivos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Patógenos Alimentares e de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Microrganismos

Foi utilizado neste estudo *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, o isolado S. Enteritidis CCS3 obtido a partir de carcaça de suíno por Lima (2002) e como cultura de referência, S. Enteritidis ATCC 13076. Ambas as culturas foram mantidas em caldo Infusão de Cérebro e Coração – BHI (Merck®) contendo 20% de glicerol e congeladas a -18°C.

3.2. Padronização das culturas

Em cada experimento, S. Enteritidis CCS3 e ATCC 13076 foram reativadas em caldo Tripticaseína e Soja (TSB) e incubadas a 37°C por, aproximadamente, 12 horas ou até que atingissem a fase estacionária de crescimento. Após esse período, as células foram coletadas em centrífuga Sorvall RT 6000D (Du Pont Company, USA), a 1275 g por 10 minutos, ressuspensas

em solução salina 0,85%, novamente centrifugadas sob as mesmas condições e padronizadas em 10^8 UFC/mL correspondente a uma densidade óptica de aproximadamente 0,60 em espectrofotômetro Spectronic 20D, em comprimento de onda de 600 nm, de acordo com a curva de calibração do Anexo.

3.3. Avaliação do efeito do pH baixo sobre o crescimento de *Salmonella* Enteritidis em Caldo Trypticaseína e Soja (TSB)

As culturas de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 padronizadas, conforme citado acima, foram inoculadas em TSB acidificado com HCL 5N para pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,2 (controle) e a uma DO_{600nm} de 0,05. Em seguida, um volume de 180 μ L desta suspensão foi transferido, em triplicata, para microplacas esterilizadas e incubadas a $37^\circ C \pm 1$. Foram realizadas leituras periódicas de DO_{600nm} em aparelho leitor de placas de ELISA (Versa Max[®] Molecular Devices) com intervalos de 30 minutos por até 12 horas. O experimento foi realizado em três repetições.

Foram construídas curvas de crescimento e calculadas as velocidades específicas de crescimento (μ). Neste trabalho, foi considerada como condição de pH que promove estresse subletal para *S. Enteritidis*, valores de pH que resultaram na diminuição da taxa de crescimento e, ou, da densidade populacional máxima alcançada quando comparado à curva controle (pH 7,2).

3.4. Avaliação do efeito do pH baixo sobre a sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis em TSB

As culturas padronizadas de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 foram inoculadas na proporção de 1:3 em caldo TSB ajustado para pH 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5, e incubadas a $37^\circ C \pm 1$. Alíquotas das suspensões de células foram retiradas em intervalos de tempo que variaram de acordo com o pH do caldo TSB. Em pH 3,0 e 3,5 as amostras foram retiradas de quatro em quatro horas, em pH 2,5 de duas em duas horas e em pH 1,5 e 2,0, de 20 em 20 minutos por até 24, 10 e quatro horas, respectivamente. Essas amostras foram plaqueadas em Ágar

Tripticaseína e Soja (TSA), pela técnica de microgotas (MORTON, 2001), em triplicata, para determinação do número de células sobreviventes. Esses experimentos foram realizados em duas repetições.

3.5. Preparo de células de *Salmonella* Enteritidis submetidas a tratamentos ácidos

As culturas de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 foram transferidas para caldo TSB acidificado com HCL 5N para pH de 4,0; 4,5 e 5,0; e incubadas a 37°C, por uma hora. Após esse período de tratamento ácido subletal, essas células foram coletadas por centrifugação, lavadas e ressuspensas em solução salina 0,85%. As suspensões de células foram padronizadas em 10⁸UFC/mL para serem utilizadas nos experimentos subsequentes.

3.6. Avaliação da sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis em carne suína estocada sob temperaturas de refrigeração e congelamento

Peças de lombo suíno (*longissimus dorsi*) foram primeiramente submetidas à radiação ultravioleta por 30 minutos em capela de fluxo laminar. Amostras de 10 g de carne foram retiradas da parte interna do músculo e colocadas em sacos plásticos estéreis.

Alíquotas de 1 mL das suspensões de células de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076, submetidas a tratamento ácido preparadas conforme item 3.5 e células do tratamento controle (sem choque) foram transferidas para essas amostras de carne, massageadas para distribuição uniforme do inóculo e incubadas a 4°C por até sete dias e a -18°C por até 84 dias. Foram utilizadas também como controle, amostras de carne não inoculadas.

As amostras de carnes mantidas sob temperaturas de refrigeração foram avaliadas nos tempos 0, 1, 3, 5 e 7 dias e aquelas mantidas sob temperatura de congelamento nos tempos 0, 14, 28, 56 e 84 dias. Para isso, 90 mL de solução salina 0,85% foram adicionados às porções de lombo suíno e homogeneizados em *stomacher* (Laboratory Blender Stomacher 400, Seward) por dois minutos.

Alíquotas foram diluídas sucessivamente e plaqueadas em ágar TSA, em triplicata, utilizando a técnica de microgotas descrita por Morton (2001) e incubadas, por aproximadamente, 10 horas a 37°C. Os experimentos foram realizados em três repetições.

3.7. Avaliação da subsequente tolerância a ácido de *Salmonella* Enteritidis em Fluido Gástrico Simulado (FGS)

Após os diferentes tempos de estocagem sob refrigeração e congelamento, a população de *S. Enteritidis* sobrevivente foi avaliada quanto à subsequente tolerância a ácido, seguindo metodologia adaptada de Campbell et al. (2004). A partir do homogenato obtido para a avaliação da sobrevivência, alíquotas de 5 mL foram retiradas e transferidas para frascos contendo 10 mL de fluido gástrico simulado (pH 1,5) e mantidas a 37°C.

O fluido gástrico simulado foi preparado de acordo com Beumer et al. (1992) e consistiu de 8,3 g/L de protease peptona; 3,5 g/L de D-glicose; 2,05 g/L de cloreto de sódio; 0,6 g/L de potássio bifosfato; 0,11 g/L de cloreto de cálcio; 0,37 g/L cloreto de potássio; 0,05 g/L de bile bovina; 0,1 g/L de lisozima e 13,3 mg/L de pepsina. O fluido foi preparado em água desionizada e, em seguida, autoclavado por 15 minutos a 121°C com exceção das soluções de lisozima e pepsina que foram filtradas em membranas (Millipore) de 0,22 µm de diâmetro e adicionadas posteriormente. O pH foi ajustado para 1,5 com solução de HCl 5N esterilizada. O fluido gástrico foi previamente aquecido a 37°C antes da mistura com as amostras do homogenato.

A tolerância ao ácido foi monitorada por meio de plaqueamento, em triplicata, utilizando a técnica de microgotas em ágar TSA, descrita por Morton (2001), em intervalos de tempo de 20 minutos por até três horas, para a cultura CCS3, e de 10 minutos por até meia hora, para a cultura ATCC 13076. O pH da mistura do FGS com o homogenato foi monitorado ao final de todos os experimentos. Esses experimentos foram realizados em três repetições.

3.8. Delineamento estatístico

O experimento foi realizado utilizando delineamento inteiramente casualizado com três repetições e analisado em esquema de parcelas subdivididas tendo nas parcelas um esquema fatorial 4x2, quatro tratamentos (um, sem tratamento ácido; e três, com tratamento ácido com pH 4,0; 4,5 e 5,0); e duas culturas de *S. Enteritidis* e nas subparcelas, os períodos de estocagem a 4°C (0, 1, 3, 5 e 7 dias) e a -18°C (0, 14, 28, 56 e 84 dias) para avaliar o efeito do tratamento ácido na sobrevivência das culturas sob baixas temperaturas.

Para avaliar a subsequente tolerância ao ácido no fluido gástrico simulado, o experimento ainda apresentou na subparcela os tempos de exposição ao fluido gástrico (0, 20, 40, 60 até 180 ou 0, 10, 20 e 30 minutos), variando de acordo com a cultura avaliada. O número de microrganismos obtido a cada intervalo de tempo de exposição ao FGS foi convertido em percentagem do número da contagem inicial (tempo zero de exposição ao FGS).

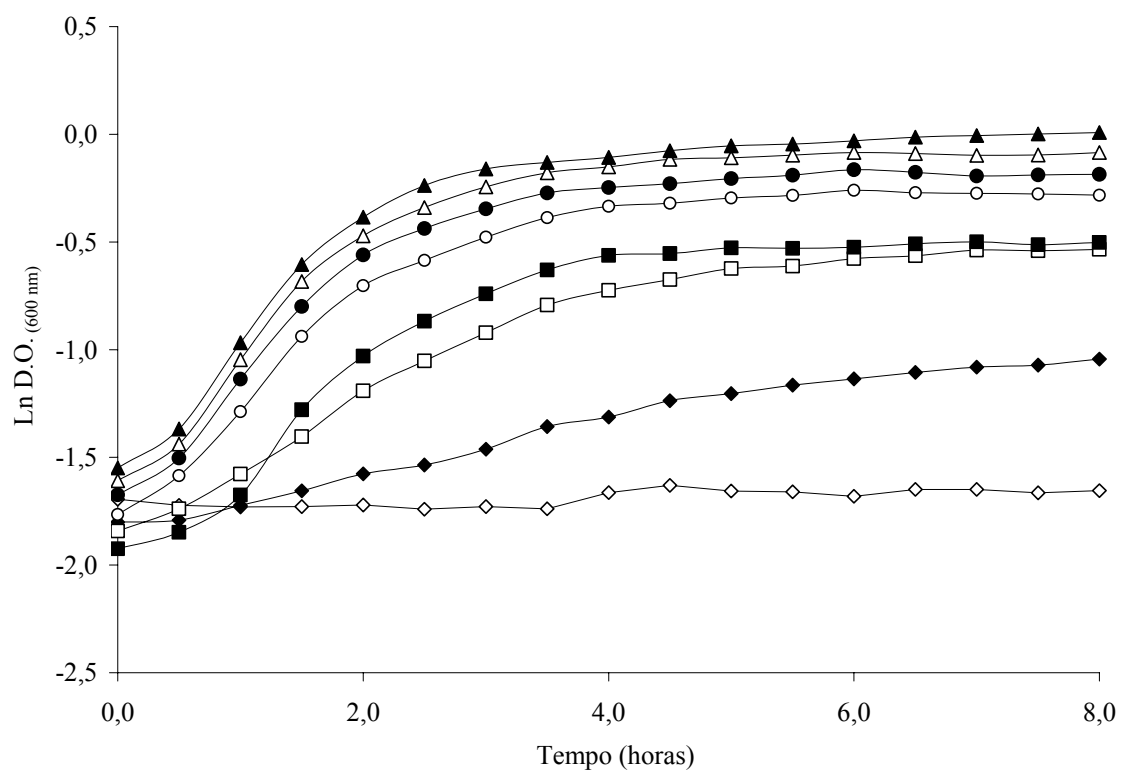
Os dados foram analisados utilizando análise de variância e de regressão. Para os fatores tratamento ácido e culturas, as médias foram comparadas utilizando-se o teste F e adotando-se o nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Para os fatores período de estocagem a 4°C e tempo de exposição ao FGS, os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste t, adotando-se o nível de até 10% de probabilidade e magnitude do coeficiente de determinação (R^2).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SAEG, versão 8.0, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

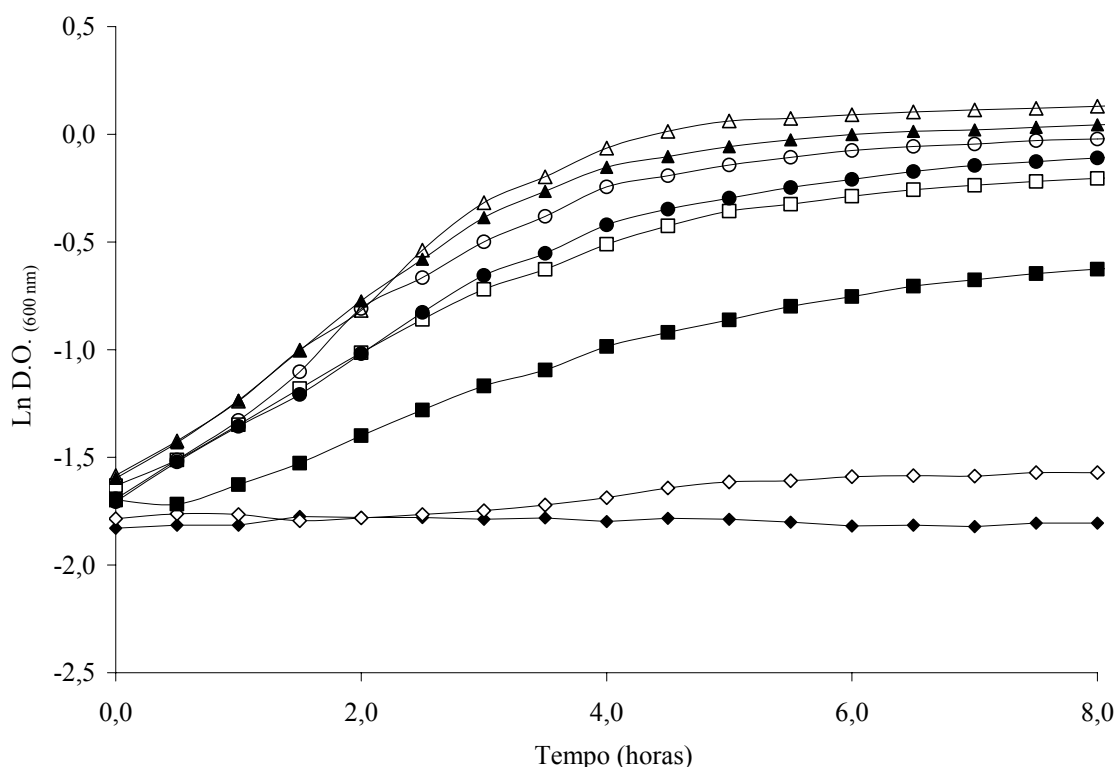
4.1. Efeito do pH sobre o crescimento e a sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis

O efeito do pH sobre o crescimento de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 está apresentado nas Figuras 1 e 2, respectivamente. *S. Enteritidis* CCS3 entrou em fase estacionária após três horas de crescimento, enquanto que a ATCC 13076 entrou após cinco horas. Não foi observado crescimento de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 em meio TSB ajustado para pH 3,5 e 4,0, respectivamente, no período de 24 horas de incubação. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por LIN et al. (1995), que verificaram que *S. Typhimurium* teve crescimento inibido em caldo Luria Bertani (LB) com pH ajustado para 4,0, e com os observados por BRYAN et al. (1979), que verificaram que *Salmonella* apresenta crescimento no intervalo de pH 4,0 a 9,0, sendo pH ótimo próximo de 7,0.



Legenda: pH 3,5 (◇); pH 4,0 (◆); pH 4,5 (□); pH 5,0 (■); pH 5,5 (○); pH 6,0 (●); pH 6,5 (Δ); pH 7,2 (▲).

Figura 1 – Crescimento de *Salmonella Enteritidis* CCS3 em Caldo Trypticaseína e Soja (TSB) a 37°C com pH ajustado entre 3,5 e 7,2.



Legenda: pH 3,5 (◇); pH 4,0 (◆); pH 4,5 (□); pH 5,0 (■); pH 5,5 (○); pH 6,0 (●); pH 6,5 (Δ); pH 7,2 (▲).

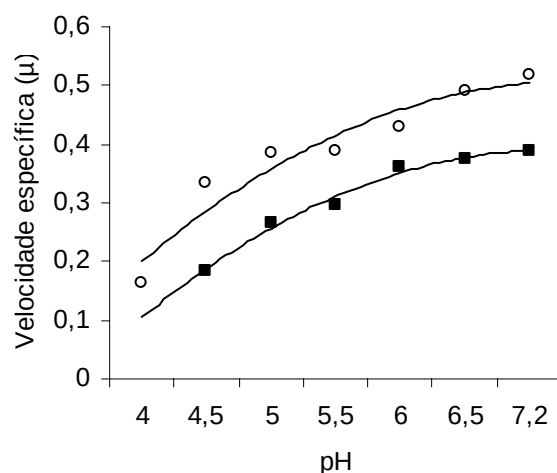
Figura 2 – Crescimento de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 em Caldo Triptícaseína e Soja (TSB) a 37°C com pH ajustado entre 4,0 e 7,2.

Na Tabela 1, são apresentados os parâmetros cinéticos de crescimento, velocidade específica de crescimento (μ) e densidade óptica máxima ($D.O_{\max}$), de ambas as culturas. A redução da velocidade específica de crescimento e da densidade óptica máxima foi observada com a diminuição do pH do meio. Além de crescer em uma faixa mais ampla de pH, *S. Enteritidis* CCS3 apresentou maiores velocidades específicas de crescimento ($p < 0,001$) do que *S. Enteritidis* ATCC 13076 em todas as condições avaliadas. Em pH 4,0 e 4,5, *S. Enteritidis* CCS3 alcançou maiores valores de $D.O_{\max}$ (Tabela 1). No entanto, em pH igual ou maior que 5,0 os valores de $D.O_{\max}$ de *S. Enteritidis* ATCC 13076 foram discretamente maiores que os de *S. Enteritidis* CCS3. Como essa variação nos valores de $D.O_{\max}$ é pequena, acredita-se que a população final de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 seja semelhante.

Tabela 1 – Velocidade específica de crescimento (μ) e densidade óptica máxima (D.O._{max}) a 600 nm de *Salmonella* Enteritidis CCS3 e ATCC 13076, cultivadas em Caldo Tripticaseína e Soja (TSB) com pH ajustado entre 4,0 e 7,2, por 12 horas

pH	S. Enteritidis CCS3		S. Enteritidis ATCC 13076	
	μ (h ⁻¹)	D.O. _(max)	μ (h ⁻¹)	D.O. _(max)
4,0	0,1644 ± 0,1145	0,3931	-	-
4,5	0,3338 ± 0,1676	0,6445	0,1852 ± 0,0098	0,5798
5,0	0,3867 ± 0,0456	0,6580	0,2675 ± 0,0208	0,8166
5,5	0,3875 ± 0,0448	0,8057	0,2949 ± 0,0158	0,8938
6,0	0,4293 ± 0,0334	0,8794	0,3611 ± 0,0272	0,9827
6,5	0,4907 ± 0,0397	1,0124	0,3766 ± 0,0042	1,0573
7,2	0,5175 ± 0,0455	1,1599	0,3882 ± 0,0108	1,1721

O pH influenciou a velocidade específica de crescimento de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076, quando este aumentou de 4,0 para 7,2 (Figura 3). Considerando que estresse é uma alteração das condições ótimas de crescimento na qual há redução da taxa de crescimento ou da sobrevivência dos microrganismos (YOUSEF; JUNEJA, 2002), a faixa de pH entre 4,0 e 6,0 foi considerada condição de estresse ácido sub-letal para *S. Enteritidis* CCS3, pois os valores de μ apresentaram redução variando de 17 a 68,2% em relação ao controle (pH 7,2) e a faixa de 4,5 a 5,5, para *S. Enteritidis* ATCC 13076 que apresentou redução de μ variando de 24 a 52,3%. Esses valores de estresse ácido subletal estão de acordo com os valores empregados em alguns estudos de tolerância ao ácido em *Salmonella*, que variam entre pH 4,0 e 6,0 (FOSTER; HALL, 1991; LEYER; JOHNSON, 1993; BAIK et al., 1996).



Legenda: *S. Enteritidis* CCS3 (○); *S. Enteritidis* ATCC 13076 (■).

Figura 3 – Efeito de diferentes valores de pH sobre a velocidade específica de crescimento (μ) de *Salmonella* Enteritidis CCS3 e ATCC 13076 em TSB a 37°C.

A incubação de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 em caldo TSB com o pH ajustado entre 1,5 e 3,5 resultou na inativação celular e o número de sobreviventes diminuiu com a queda do pH do meio de cultura (Tabela 2). *S. Enteritidis* CCS3 demonstrou ser mais tolerante ao pH baixo e a redução do número de ciclos logarítmicos foi sempre menor do que a redução observada para *S. Enteritidis* ATCC 13076 (Tabela 2).

A sobrevivência de *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi semelhante à de *S. Enteritidis* CCS3 em pH 3,5. Em pH menores que 3,5, a redução média de ciclos logarítmicos da população de *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi sempre superior a de *S. Enteritidis* CCS3. Além disso, o tempo necessário para essa queda de ciclos logarítmicos foi sempre menor para *S. Enteritidis* ATCC 13076. Nos valores de pH 1,5 e 2,0, um período de exposição de cerca de três vezes menor foi suficiente para a redução da população da cultura ATCC 13076 abaixo do valor do limite de detecção (10^2 UFC/mL).

Tabela 2 – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) de *Salmonella* Enteritidis CCS3 e ATCC 13076 em Caldo Tripticaseína e Soja (TSB) a 37°C com pH ajustado entre 1,5 e 3,5

Estirpe	pH	População inicial	População final	Δ^*	Tempo** (h)
S. Enteritidis CCS3	3,5	8,27	7,77	0,50	24
	3,0	8,38	6,88	1,50	24
	2,5	7,59	6,11	1,48	10
	2,0	8,00	$\leq 2,00^{***}$	$\geq 6,00$	4
	1,5	7,36	$\leq 2,00$	$\geq 5,36$	4
S. Enteritidis ATCC 13076	3,5	8,58	8,00	0,58	24
	3,0	8,50	2,64	5,86	24
	2,5	8,50	$\leq 2,00$	$\geq 6,50$	8
	2,0	8,58	$\leq 2,00$	$\geq 6,58$	1,3
	1,5	8,53	$\leq 2,00$	$\geq 6,53$	1

* Diferença entre populações inicial e final, corresponde à redução em ciclos logarítmicos.

** Tempo máximo avaliado em horas para cada condição de pH.

*** Valor corresponde ao limite de detecção da técnica de microgotas.

Os resultados de sobrevivência em pH 3,0 foram semelhantes para *S. Typhimurium* que, crescida até fase estacionária, sobreviveu em meio mínimo ajustado com pH 3,0 por mais de quatro horas (LIN et al., 1995). Outros trabalhos indicam que *E. coli* K-12 e *S. flexneri*, crescidas até a fase estacionária, sobreviveram por várias horas em pH 2,0 e 3,0, sendo que esses valores são considerados menores que o limite de pH para crescimento que é de, aproximadamente, 4,5 (SMALL et al., 1994).

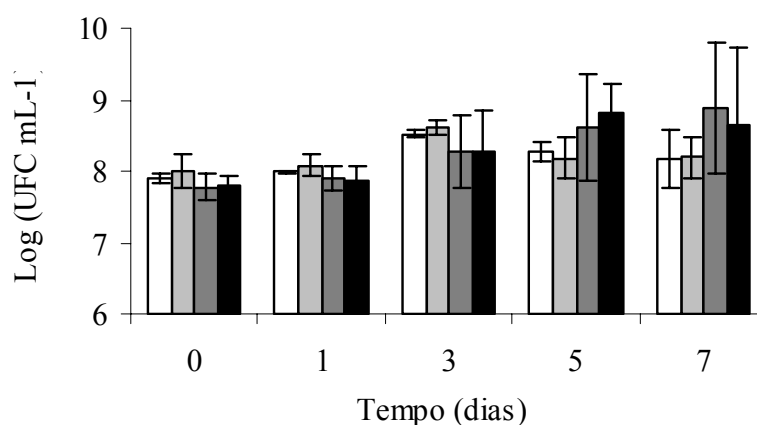
Os dados obtidos quanto ao efeito do pH sobre o crescimento e sobrevivência de *S. Enteritidis* evidenciam diferença entre as culturas CCS3 e ATCC 13076 quanto à resistência natural ao pH baixo nas condições testadas. *S. Enteritidis* CCS3 apresentou maior crescimento e sobrevivência que *S. Enteritidis* ATCC 13076. A maior resistência do isolado *S. Enteritidis* CCS3 pode ser devida ao fato de se tratar de um isolado de campo, isto é, obtido na linha de abate de suínos, podendo estar mais adaptado ou ser naturalmente mais resistente como

resultado da seleção em função das condições ambientais a que teria sido submetido.

4.2. Viabilidade de *Salmonella* Enteritidis em carne suína e estocada sob temperatura de refrigeração

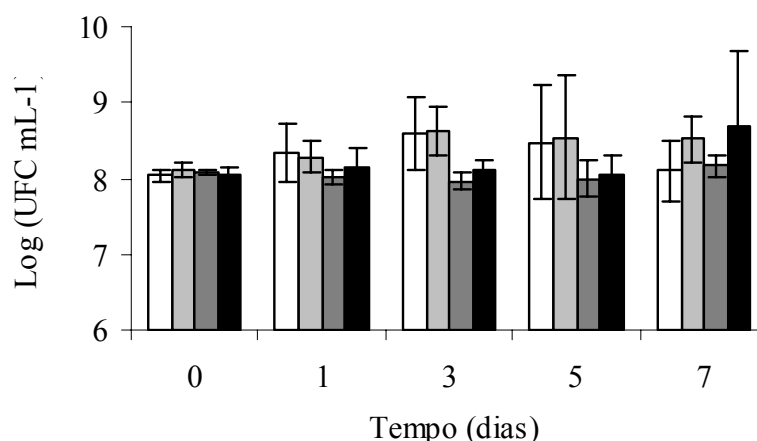
Baseado nos resultados relativos ao efeito de pH sobre o crescimento das culturas de *S. Enteritidis* estudadas, avaliou-se o comportamento dessas quando inoculadas em carne suína mantida sob refrigeração, após tratamento ácido em pH 4,0; 4,5 e 5,0.

As Figuras 4 e 5 ilustram o comportamento durante a estocagem das culturas *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076, após serem submetidas a tratamento ácido prévio. Essas culturas apresentaram comportamento diferente ($p < 0,05$) nas condições avaliadas e o tempo de estocagem também teve influência significativa ($p < 0,001$) no comportamento das culturas. No entanto, o tratamento ácido prévio nos diferentes valores de pH não alterou a sobrevivência de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 inoculadas em carne suína, durante a estocagem a 4°C por sete dias.



Legenda: Células submetidas a tratamento ácido em pH: □ 4,0; ▒ 4,5; ▓ 5,0 e ■ 7,2 (controle).

Figura 4 – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis CCS3 inoculadas em carne suína mantida sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) por até sete dias.



Legenda: Células submetidas a tratamento ácido em pH: □ 4,0; ▒ 4,5; ▓ 5,0 e ■ 7,2 (controle).

Figura 5 – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 inoculadas em carne suína mantida sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) por até sete dias.

As células de *S. Enteritidis* submetidas aos tratamentos ácidos prévios e não submetidas a choque (controle) apresentaram variação da população após sete dias de refrigeração. Observa-se que *S. Enteritidis* CCS3 apresentou aumento no número de UFC/g ao longo do tempo de estocagem (Figura 4). O aumento médio da população de *S. Enteritidis* CCS3 foi de 0,6 ciclo logarítmico ao final de sete dias de incubação. A população de *S. Enteritidis* ATCC 13076 manteve-se estável, apresentando variação de apenas 0,1 ciclo logarítmico ao final de sete dias de incubação (Figura 5). Esse comportamento sugere que a *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi mais sensível ao efeito da temperatura de refrigeração do que *S. Enteritidis* CCS3, e confirma que a temperatura de refrigeração não foi suficiente para diminuir ou inibir a população de *Salmonella* Enteritidis previamente inoculada na carne suína.

Neste trabalho, *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi mais sensível que *S. Enteritidis* CCS3 quando submetida ao estresse ácido e também sob temperatura de refrigeração nas condições avaliadas. Esse fato pode estar relacionado às diferenças entre as culturas CCS3 e ATCC 13076 na expressão de genes que

codificam proteínas necessárias para o reparo e proteção de componentes celulares envolvidas nos mecanismos de resistência a esses tipos de estresse.

Na literatura há relatos que a síntese de proteínas do choque frio é capaz de proteger os microrganismos durante a refrigeração como relatado por Jeffreys et al. (1998). Esses autores demonstraram o crescimento de *S. Enteritidis* sob a temperatura de 10°C em caldo LB e verificaram que o número de células viáveis permaneceu inalterado após estocagem a 5°C, por até 56 horas. Verificaram também, por meio da análise de proteínas a expressão da proteína CS7.4, a qual foi similar àquela observada em *E. coli* sob as mesmas condições. Foi observada grande homologia do gene *cspA* que codifica essa proteína entre *S. Enteritidis* e *E. coli* (JEFFREYS et al., 1998).

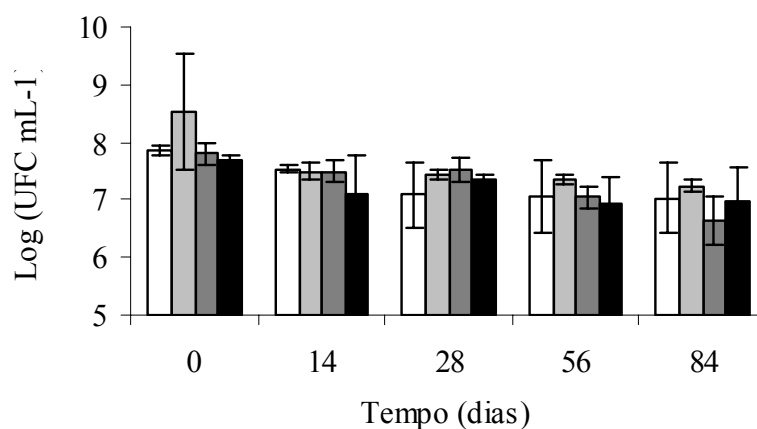
Outro mecanismo importante que está relacionado com a maior tolerância de bactérias em baixas temperaturas é o acúmulo de solutos compatíveis como trealose, glicina, betaina, carnitina, dentre outros, por captação do meio extracelular ou por síntese como observado para *E. coli*, cuja viabilidade sob baixas temperaturas mostrou-se dependente da síntese de trealose (KANDROR et al., 2002).

4.3. Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis em carne suína e estocada sob temperatura de congelamento

Avaliou-se o comportamento de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 após serem submetidas a tratamento ácido prévio (pH 4,0; 4,5 e 5,0) e sem choque (controle) inoculadas em carne suína e mantidas sob congelamento (−18°C) por 84 dias.

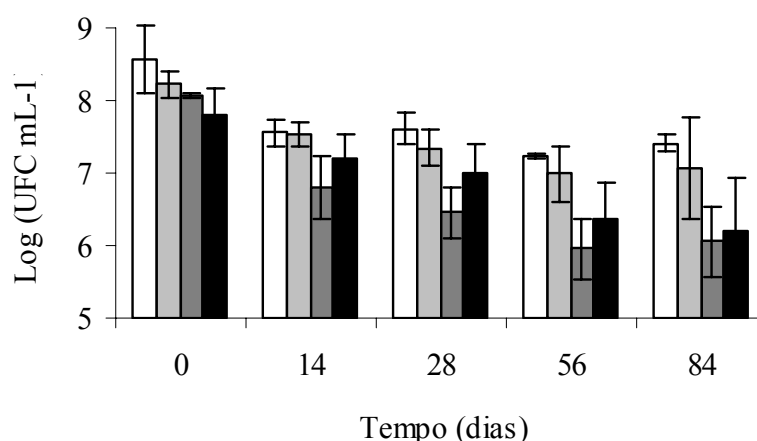
A análise de variância para o estudo sob temperatura de congelamento foi semelhante à obtida para refrigeração. Foi verificada diferença significativa quanto à sobrevivência entre as culturas ($p < 0,01$) e entre os períodos de estocagem ($p < 0,001$) (Figuras 6 e 7). Observou-se também que o tratamento ácido prévio na faixa de pH 4,0 a 5,0 não influenciou ($p > 0,05$) a sobrevivência das culturas de *S. Enteritidis* sob temperatura de congelamento. Isso sugere que a

exposição de *S. Enteritidis* a ambientes ácidos moderados antes da estocagem sob congelamento parece não ser relevante, pois não houve alteração na sobrevivência da população de *S. Enteritidis* em carne suína.



Legenda: Células submetidas a tratamento ácido em pH: □ 4,0; ▒ 4,5; ▓ 5,0 e ■ 7,2 (controle).

Figura 6 – Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis CCS3 inoculada em carne suína mantida sob temperatura de congelamento ($-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$) por até 84 dias.



Legenda: Células submetidas a tratamento ácido em pH: □ 4,0; ▒ 4,5; ▓ 5,0 e ■ 7,2 (controle).

Figura 7 – Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 inoculadas em carne suína mantida sob temperatura de congelamento ($-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$) por até 84 dias.

Verificou-se que ambas as culturas apresentaram redução da população com o aumento do tempo de estocagem (Figuras 6 e 7). A redução média na população de células viáveis de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 foi de, aproximadamente, 0,8 (Figura 6) e de 1,5 ciclos logarítmicos (Figura 7), respectivamente. Esse resultado reforça a evidência anterior de que a cultura ATCC 13076 é mais sensível a baixas temperaturas do que a cultura CCS3, quando inoculadas em carne suína.

Vários trabalhos relatam a sobrevivência de *Salmonella* inoculada em carnes mantidas sob congelamento. *S. Typhimurium* manteve-se praticamente estável quando congelada em carne de peixe a -22°C e estocada a $-17,9^{\circ}\text{C}$ por um ano, apresentando redução nas contagens de apenas um ciclo logarítmico (RAJ; LISTON, 1961). Segundo Barrell (1988), *S. Typhimurium* também se apresentou resistente ao congelamento e estocagem a -20°C em carne bovina em experimento realizado por Georgala e Hurst (1963); entretanto, os isolados testados neste trabalho, demonstraram ser muito mais susceptíveis a ciclos repetidos de congelamento e descongelamento. *Salmonella* Typhimurium U285 após a estocagem por 10 semanas em -18 a -20°C em carne bovina moída e cozida, mistura para lingüiça bovina e caldo contendo triptona de soja e extrato de levedura apresentou maior sobrevivência em carne bovina (50%), seguida pela mistura para lingüiça (27%) e pelo meio de cultura (14%) (BARRELL, 1988). A diminuição da população de sorovares de *Salmonella* em carne suína, naturalmente contaminada e armazenada sob congelamento a $-15^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 78 semanas foi de aproximadamente três ciclos logarítmicos com variação de 2×10^3 a 2×10^4 Número Mais Provável (NMP)/g para 20 NMP/g (ESCARTÍN et al., 2000). O número de células sobreviventes de seis isolados de *Salmonella* sp. em carne suína mantida sob temperatura de -15°C , reduziu média de 1,4 ciclo logarítmico após 20 semanas de estocagem (MENDES, 2005).

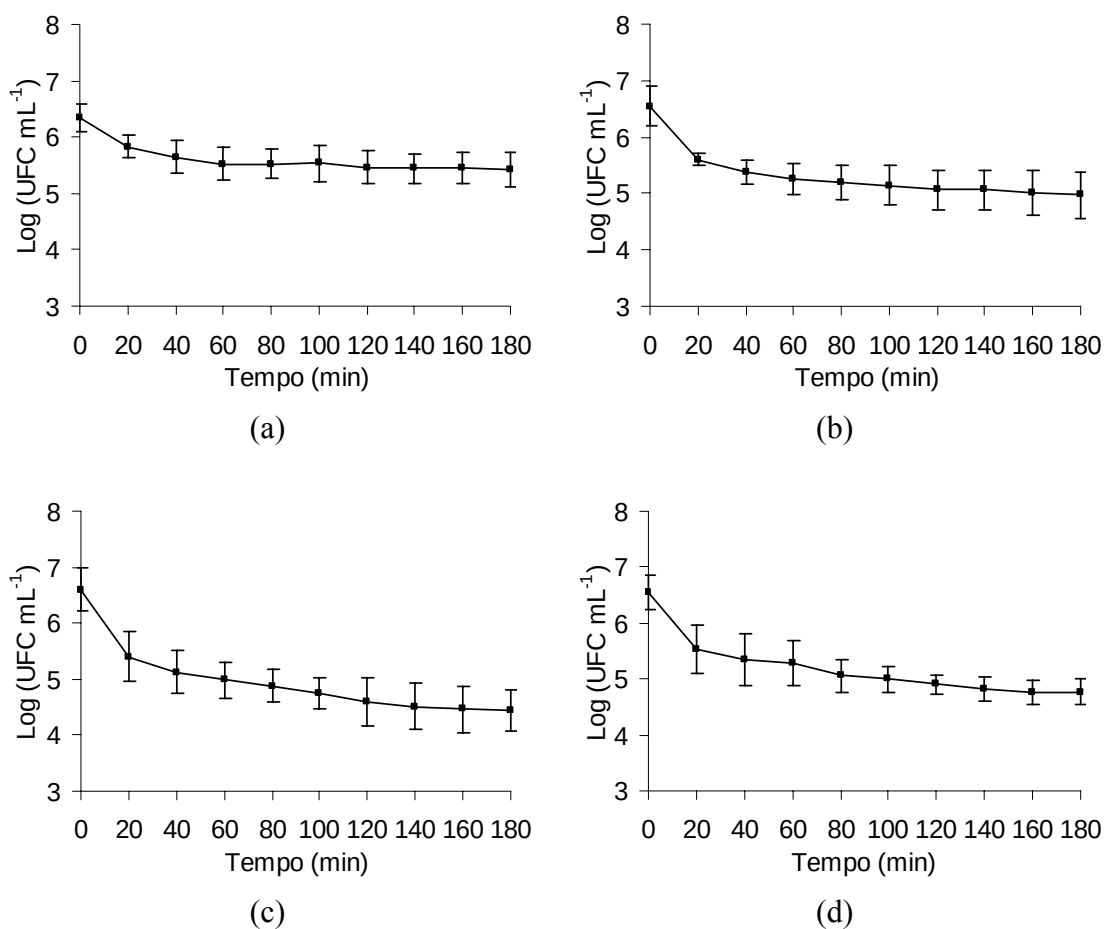
A resistência exibida por bactérias, particularmente do gênero *Salmonella*, à estocagem sob congelamento em carnes, evidenciada nesse trabalho e por outros autores, mostra a importância de estudos na própria matriz do alimento e do rigoroso controle da qualidade da carne antes do congelamento.

4.4. Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis em Fluido Gástrico Simulado (FGS)

O tempo de exposição ao FGS e o valor de pH do tratamento ácido prévio ao qual *S. Enteritidis* foi submetido teve efeito sobre a subsequente tolerância ao ácido em FGS. Para a cultura CCS3 inoculada em carne suína e mantida sob refrigeração e congelamento, foi detectado efeito ($p < 0,001$) da interação entre o tempo de exposição ao FGS e o valor de pH do tratamento ácido prévio, conforme apresentado nas Figuras 8 e 9.

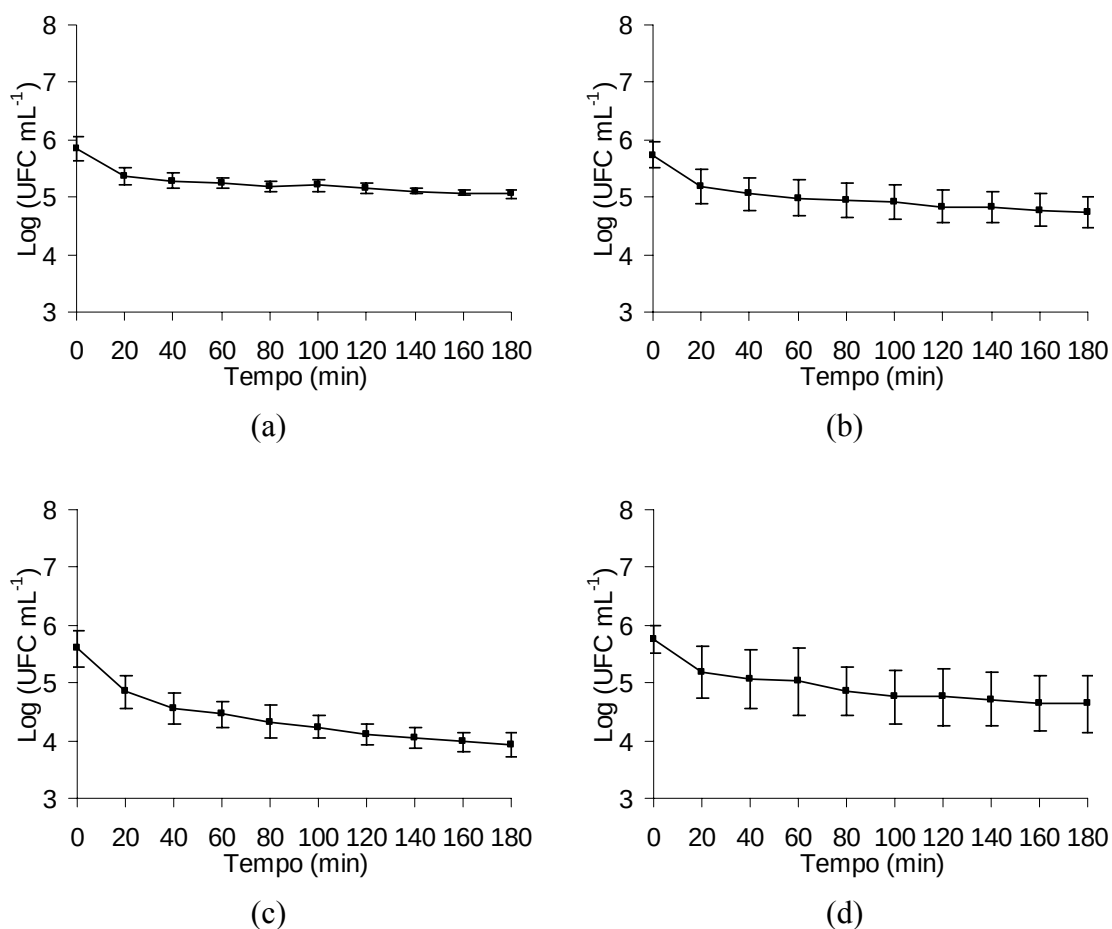
A redução da população de sobreviventes da cultura CCS3 foi mais acentuada nos primeiros 20 minutos de exposição. Após esse período, observou-se uma redução gradativa no número de células viáveis indicando uma adaptação ou tolerância dessa cultura sob condições ácidas (Figuras 8 e 9). A população inicial (T_0) de CCS3 era de aproximadamente 6,5 ciclos logarítmicos após sete dias de refrigeração (Figura 8) e de 5,75 ciclos logarítmicos após 84 dias de congelamento (Figura 9) e a população final após exposição por 180 minutos ao FGS chegou a 4,9 e 4,5 ciclos logarítmicos, respectivamente (Figuras 8 e 9). A redução média da população de CCS3 foi de aproximadamente 1,4 ciclo logarítmico, após o desafio com o FGS.

S. Enteritidis CCS3 submetida a tratamento ácido prévio em pH 4,0 e mantida sob baixas temperaturas, apresentou redução de apenas 15% no número de ciclos logarítmicos ao final de 180 minutos de exposição ao FGS (Figuras 8a e 9a). Para os demais tratamentos ácidos prévios, pH 4,5 e 5,0, assim como na ausência de tratamento ácido (tratamento controle), observou-se decréscimo gradual da população de sobreviventes da cultura CCS3 ao longo do tempo de exposição e a redução máxima da população alcançada foi de aproximadamente 30% (Figuras 8b, 8c, 8d, 9b, 9c e 9d). Esse comportamento indica que o choque prévio ácido com valor de 4,0 e frio proporciona uma maior sobrevivência de *S. Enteritidis* CCS3 em ambientes mais ácidos, como o FGS.



Legenda: (a) células submetidas a tratamento ácido pH 4,0; (b) células submetidas a tratamento ácido pH 4,5; (c) células submetidas a tratamento ácido pH 5,0; e (d) células não tratadas, pH 7,2 (controle).

Figura 8 – Sobrevivência de *Salmonella Enteritidis* CCS3 em Fluido Gástrico Simulado (FGS) após tratamento ácido prévio com diversos valores de pH por uma hora e estocagem sob refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ por sete dias.



Legenda: (a) células submetidas a tratamento ácido pH 4,0; (b) células submetidas a tratamento ácido pH 4,5; (c) células submetidas a tratamento ácido pH 5,0; (d) células não tratadas, pH 7,2 (controle).

Figura 9 – Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis CCS3 em Fluido Gástrico Simulado (FGS) após tratamento ácido prévio com diversos valores de pH, por uma hora e estocagem sob temperatura de congelamento a $-18 \pm 1^\circ\text{C}$, por 84 dias.

Outros trabalhos indicam que *S. Typhimurium* adaptada a condições ácidas moderadas, se torna mais tolerante a outros estresses, tais como altas temperaturas, sal, cristal violeta e polimixina B (LEYER; JOHNSON, 1993; KOUTSOMANIS; SOFOS, 2004). As células de *S. Typhimurium* adaptadas a pH 5,8 foram mais tolerantes a temperaturas de 45 e 50°C, a pH 4,0 acidificado com ácido acético e láctico e a concentração de 8% de NaCl (TOSUN; GÖNUL, 2003).

Foi observado também, por Gyun e Marshall (2004), que células de *E. coli* O157:H7 apresentaram sobrevivência maior em FGS quando submetidas à adaptação em caldo TSB com pH 5,0 e 6,0 que àquelas mantidas previamente em pH 7,3; 8,3 e 9,0.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que a exposição ao FGS, pH 1,5, não promove redução expressiva da população de CCS3, podendo-se considerar que contaminações de carnes suínas por esse patógeno representam risco potencial para a saúde dos consumidores. Cabe ressaltar que o pH da mistura do FGS com o homogenato variou de 1,9 a 2,2, durante todo o experimento. Esses valores de pH são compatíveis com os valores médios encontrados no ambiente do estômago em humanos (MARTINSEN et al., 2005). Além disso, o tipo de alimento pode influenciar essa sobrevivência, pois, sorovares de *Salmonella* expostos a pH 2,5 sobreviveram melhor quando foram inoculados em alimentos protéicos como bife de boi e ovos, comprovando que o alimento possa favorecer a passagem de bactérias patogênicas pelo trato gastrointestinal (WATERMAN; SMALL, 1998). Tamplin (2005) também observou maior sobrevivência de estirpes de *E. coli* O157:H7 em FGS, previamente inoculadas em carne bovina moída do que mantidas em solução salina. Para esse autor essa constatação justifica-se pelo aumento do pH da mistura do FGS e carne (pH 2,4), se comparado ao pH da mistura do FGS e solução salina que permaneceu em torno de 1,5.

Foi observado também que o período de estocagem sob refrigeração e sob congelamento não proporcionou efeito ($p > 0,05$) sobre a subsequente sobrevivência ao FGS em *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 (Figuras 8 e 9) (Tabelas 3 e 4). Em outro estudo, Uljas e Ingham (1998) verificaram sobrevivência semelhante de *E. coli* O157:H7 em FGS após estocagem em suco de maçã pH 3,5 e 6,5 (controle) sob temperatura de 4°C, sugerindo assim que baixas temperaturas aumentam a tolerância ao ácido de *E. coli* O157:H7 em suco de maçã.

Vários trabalhos têm indicado maior tolerância ao ácido de *E. coli* O157:H7 quando essa bactéria é mantida estocada sob refrigeração (MILLER;

KASPAR, 1994; LIN et al., 1995; CLAVERO; BEUCHAT, 1996; CHENG; KASPAR, 1998), porém esse efeito não foi observado para *S. Enteritidis* utilizada nesse estudo.

Para ATCC 13076, foi verificado pela análise de variância que o fator tempo de exposição ao FGS proporcionou redução significativa ($p < 0,001$) da população de *S. Enteritidis* ATCC 13076 inoculada em carne suína mantida sob refrigeração e sob congelamento (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 em Fluido Gástrico Simulado (FGS) após tratamento ácido prévio em pH 4,0; 4,5; 5,0 e 7,2, por uma hora e estocagem sob temperatura de refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, por sete dias

pH	Tempo (minutos)			
	0	10	20	30
pH 4,0	6,48	$\leq 2,0^*$	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$
pH 4,5	6,38	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$
pH 5,0	6,55	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$
pH 7,2	6,7	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$

* Valor corresponde ao limite de detecção da técnica de microgotas.

Tabela 4 – Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 em Fluido Gástrico Simulado (FGS) após tratamento ácido prévio em pH 4,0; 4,5; 5,0 e 7,2, por uma hora e estocagem sob temperatura de congelamento a $-18 \pm 1^\circ\text{C}$, por 84 dias

pH	Tempo (minutos)			
	0	10	20	30
pH 4,0	5,3	$\leq 2,0^*$	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$
pH 4,5	4,98	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$
pH 5,0	4,25	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$
pH 7,2	4,4	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$	$\leq 2,0$

* Valor corresponde ao limite de detecção da técnica de microgotas.

A população de *S. Enteritidis* ATCC 13076, submetida ao tratamento ácido prévio em todos os valores pH avaliados e no controle, inoculada em carne suína e estocada sob refrigeração por sete dias, apresentou redução de pelo menos quatro ciclos logarítmicos após 10 minutos de exposição ao FGS, indicando grande sensibilidade desta bactéria ao ambiente ácido. Essa redução é apresentada até o limite da técnica empregada neste estudo que é de 10^2 UFC/mL. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos ácidos prévios e o controle quanto a sobrevivência de *S. Enteritidis* ATCC 13076 inoculado em carne suína mantida sob refrigeração e congelamento.

A diferença é acentuada entre as culturas de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13079 com relação à sobrevivência no FGS, enquanto a maior parte da população de CCS3 permanece viável por mais de três horas de exposição ao FGS (Figuras 8 e 9). A população de ATCC 13076 apresenta intensa perda da culturabilidade, em apenas 10 minutos de exposição (Tabelas 3 e 4). Esse resultado é muito similar ao observado em *S. Typhimurium*, que perdeu culturabilidade em apenas cinco minutos ao ser submetida ao FGS (ROERING et al., 1999).

Esse resultado indica que *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 superam baixas temperaturas em carnes suínas após serem submetidas a tratamento ácido prévio, no entanto, é menos provável que a cultura ATCC 13076 sobreviva à passagem pelo suco gástrico do estômago.

Não foi observado, neste trabalho, aumento da tolerância ao ácido após estocagem sob baixas temperaturas para ambas as culturas de *S. Enteritidis*, não caracterizando o fenômeno da resistência cruzada.

Após os resultados obtidos, sugere-se que um contato prévio das células de *S. Enteritidis* CCS3 com soluções ácidas, como as empregadas para descontaminação de carcaças e sanitização de áreas de abates, pode resultar em células mais tolerantes ao ácido.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

S. Enteritidis CCS3 apresentou valores maiores de velocidade específica de crescimento em TSB acidificado e sobreviveu por mais tempo em pH inferior a 3,5 do que *S. Enteritidis* ATCC 13076. *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 não foram inibidas pela temperatura de refrigeração em carne suína. A população de CCS3 aumentou 0,6 ciclo logarítmico em carne suína, após sete dias. A cultura ATCC 13076 não variou nas mesmas condições.

Após 84 dias de congelamento, as reduções médias das populações de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 em carne suína foram de 0,8 e 1,5 ciclos logarítmicos, respectivamente.

O tratamento ácido prévio não teve efeito sobre *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 estocadas em temperaturas baixas.

A estocagem sob temperaturas baixas não influenciou a subsequente sobrevivência de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 em fluido gástrico simulado. Os fatores tempo de exposição ao FGS e valor de pH do tratamento ácido prévio têm efeito significativo sobre a sobrevivência das culturas CCS3 e ATCC 13076. Células de *S. Enteritidis* CCS3 submetidas a tratamento ácido prévio com pH 4,0 apresentaram maior sobrevivência ao FGS.

Houve diferença pronunciada entre as culturas com relação à sobrevivência em FGS, enquanto *S. Enteritidis* ATCC 13076 perdeu

culturabilidade após 10 minutos de desafio, *S. Enteritidis* CCS3 apresentou tolerância por até três horas.

Os resultados sugerem que a estocagem sob temperaturas baixas, apesar de ser uma condição de estresse, não teve influência sobre a capacidade de sobreviver ao fluido gástrico simulado, nesse caso não caracterizando um fenômeno de resistência cruzada.

Este estudo revela que *S. Enteritidis* CCS3 submetida a tratamento ácido prévio, quando presente na carne suína estocada sob baixas temperaturas, pode sobreviver à condição de baixo pH, semelhante à barreira gástrica do estômago humano. Este fato indica que a ingestão de carne suína contaminada com esse sorovar pode representar um risco para a saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS

ABEE, T.; WOUTERS, J.A. Microbial stress response in minimal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 65-91, 1999.

ABIPECS EM FOCO, n. 44, 8 p., 2005.

ALBAN, L.; STÄRK, K.D.C. Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* prevalence in the slaughtered swine carcass effectively? **Preventive Veterinary Medicine**, v. 68, p. 63-79, 2005.

ALTEKRUSE, S.F.; COHEN, M.L.; SWERDLOW, D.L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Foodborne Diseases**, v. 3, n. 3, p. 285-293, 1997.

ARCHER, D.L. Freezing: an underutilized food safety technology? **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 127-138, 2004.

ARNOLD, K.W.; KASPAR, C.W. Starvation and stationary phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 2037-2039, 1995.

ARVIZU-MEDRANO, S.M.; ESCARTÍN, E.F. Effect of acid shock with hydrochloric, citric and lactic acids on the survival and growth of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in acidified media. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 10, p. 2047-2053, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS – ABCS. **Suinocultura**: estatísticas. Disponível em: <<http://www.abcs.com.br>>. Acesso em: 12 abr. 2006.

AUDIA, J.P.; WEBB, C.C.; FOSTER, J.W. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 97-106, 2001.

BACON, R.T.; RANSOM, J.R.; KENDALL, P.A.; BELK, K.E.; SMITH, G.C. Thermal inactivation of susceptible and multiantimicrobial-resistant *Salmonella* strains grown in the absence or presence of glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4123-4128, 2003a.

BACON, R.T.; SOFOS, J.N.; KENDALL, P.A.; BELK, K.E.; SMITH, G.C. Comparative analysis of acid resistance between susceptible and multi-antimicrobial-resistant *Salmonella* strains cultured under stationary-phase acid tolerance-inducing and no inducing conditions. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 5, p. 732-740, 2003b.

BAIK, H.S.; BEARSON, S.; DUNBAR, S.; FOSTER, J.W. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. **Microbiology**, v. 142, p. 3195-3200, 1996.

BANG, I.S.; KIM, B.H.; FOSTER, J.W.; PARK, Y.K. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 8, p. 2245-2252, 2000.

BANG, I.S.; AUDIA, J.P.; PARK, Y.K.; FOSTER, J.W. Autoinduction of the OmpR response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1235-1250, 2002.

BARRELL, R.A.E. The survival and recovery of *Salmonella typhimurium* phage type U285 in frozen meats and tryptone soya yeast extract broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 309-316, 1988.

BÄUMLER, A.J.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, v. 287, p. 50-61, 2000.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 1-20, 2004.

BEARSON, S.; BEARSON, B.; FOSTER, J.W. Acid stress response in enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 147, p. 173-180, 1997.

BEARSON, B.L.; WILSON, L.; FOSTER, J.W. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 9, p. 2409-2417, 1998.

BEARSON, S.M.; BEARSON, B.L.; RASMUSSEN, M.A. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes important for survival in the swine gastric environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2829-2836, 2006.

BELI, E.; TELO, A.; DURAKU, E. *Salmonella* serotypes isolated from chicken meat in Albania. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 263-266, 2001.

BERENDS, B.R.; KNAPEN, F.V.; SNIJDERS, J.M.A.; MOSSEL, D.A.A. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 199-206, 1997.

BERRY, E.D.; CUTTER, C.N. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1493-1498, 2000.

BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatido em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisas Veterinárias Brasileiras**, v. 24, n. 2, p. 80-84, 2004.

BESSER, T.E.; GOLDOFT, M.; PRITCHETT, L.C. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT 104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. **Epidemiology and Infection**, v. 124, p. 193-200, 2000.

BEUMER, R.R.; VRIES, J.; ROMBOUTS, F.M. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 153-163, 1992.

BOOTH, I.R.; CASH, P.; O'BYRNE, C. Sensing and adapting to acid stress. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 33-42, 2002.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 9-25, 1996.

BOTTELDOORN, N.; HEYNDRICKX, M.; RIJSENS, N.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in slaughterhouse. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 891-903, 2003.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BRYAN, F.L.; FANELLI, M.J.; RIEMANN, H. *Salmonella* infections. In: RIEMANN, H.; BRYAN, F.L. **Foodborne infections and intoxications**. London: Academic Press, 1979. p. 74-130.

CAMPBELL, J.; BANG, W.; ISONHOOD, J.; GERARD, P.D.; DRAKE, M.A. Effects of salt, acid, and MSG on cold storage survival and subsequent acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 21, p. 727-735, 2004.

CASEY, P.G.; CONDON, S. Sodium chloride decreases the bactericidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p.199-206, 2002.

CASTANIE-CORNET, M.P.; PENFOUND, T.A.; SMITH, D.; ELLIOTT, J.F.; FOSTER, J.W. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 11, p. 3525-3535, 1999.

CASTRO, F.A.; SANTOS, V.R.; MARTINS, C.H.G.; FERNANDES, S.A.; ZAIA, J.E.; MARTINEZ, R. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. **The Brazilian Journal of Infections Diseases**, v. 6, n. 5, p. 244-251, 2002.

CAUDURO, P.F.; MEZZANI, A.; DIAS, C.A.G. Isolamento de *Salmonella* Tennessee em fezes humanas no Rio Grande do Sul. **Revista de Microbiologia**, v. 17, n. 2, p. 113-159, 1986.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. ***Salmonella* surveillance**: annual summary – 2004. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2004/SalmonellaIntroduction2004.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2006.

CHENG, C.M.; KASPAR, C.W. Growth and processing conditions affecting acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 157-166, 1998.

CLAVERO, M.R.; BEUCHAT, L.R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity and temperature and suitability of media for its recovery. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2737-2740, 1996.

COX, N.A.; BERRANG, M.E.; CASON, J.A. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs: a review. **Poultry Science**, v. 79, n. 11, p. 1571-1574, 2000.

CROSA, J.H.; BRENNER, D.J.; EWING, W.H.; FALKOW, S. Molecular relationships among the salmonellae. **Journal of Bacteriology**, v. 115, p. 307-315, 1973.

D'AOUST, J.Y. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, DC: ASM Press, 1997. p. 129-158.

DIAS, R.S.; CARMO, L.S.; SILVA, M.C.C. Surto de toxinfecção alimentar causado pela ação simultânea de enterotoxina estafilocócica e *Salmonella* Enteritidis. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 7-11, 1999.

DODD, C.E.R.; ALDSWORTH, T.G. The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 189-194, 2002.

DUFFY, E.A.; BELK, K.E.; SOFOS, J.N.; SMITH, G.C.; BELLINGER, G.R.; PAPE, A. Extent of microbial contamination in United States pork retail products. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 172-178, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Termo de abertura. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2., 2001, Concórdia, SC. **Anais...** Concórdia, 2002. p. viii.

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

ESPER, M.R.N.R.; FREITAS, A.M.; FERNANDES, S.A.; NEME, S.N.; TAVECHIO, A.T.; ROMÃO, M.M.; CAFÉ, M.L. *Salmonella*: sorovares identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 57, n. 2, p. 45-50, 1998.

FLETCHER, S.A.; CSONKA, L.N. Characterization of the induction of increased thermotolerance by high osmolarity in *Salmonella*. **Food Microbiology**, v. 15, p.307-317, 1998.

FOSTER, J.W. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 7, p. 1981-1987, 1993.

FOSTER, J.W. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p.170-174, 1999.

FOSTER, J.W. Acid stress response of *Salmonella* and *E. coli*: survival mechanisms, regulation, and implications for pathogenesis. **Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 89-94, 2001.

FOSTER, P.L. Stress responses and genetic variation in bacteria. **Mutation Research**, v. 569, p. 3-11, 2005.

FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 2. p. 771-778, 1990.

FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 16, p. 5129-5135, 1991.

FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (fur) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 3, p. 4317-4323, 1992.

FOSTER, J.W.; MORENO, M. Inducible acid tolerance mechanisms in enteric bacteria. **Novartis Foundation Symposium**, v. 221, p. 55-69, 1999.

FRATAMICO, P.M. Tolerance to stress and ability of acid-adapted and non-acid-adapted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104 to invade and survive in mammalian cells *in vitro*. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 7, p. 1115-1125, 2003.

FRENZEN, P.; RIGGS, T.; BUZBY, J.; BREUER, T.; ROBERTS, T.; VOETSCH, D.; REDDY, S. FoodNet working group: *Salmonella* cost estimate updated using FoodNet data. **Food Review**, v. 22, n. 2, p.10-15, 1999.

GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 93-100, 1999.

GAWANDE, P.V.; BHAGWAT, A.A. Inoculation onto solid surfaces protects *Salmonella* spp. during acid challenge: a model study using polyethersulfone membranes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 86-92, 2002.

GEORGALA, D.L.; HURST, A. The survival of food poisoning bacteria in frozen foods. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 26, p. 346-358, 1963.

GIOVANNINI, A.; PRENCIPE, V.; CONTE, A.; MARINO, L.; PETRINI, A.; POMILIO, F.; RIZZI, V.; MIGLIORATI, G. Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. **Food Control**, v. 15, p. 139-144, 2004.

GONGAGUL, G.; GUNAYDIN, K.E.; CARLI, T. Antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis of human and chicken origin. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 28, p. 911-914, 2004.

GREENACRE, E.J.; BROCKLEHURST, T.F. The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, 2006. (in press).

GYUN, H.; MARSHALL, D.L. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3500-3505, 2004.

HALL, H.K.; FOSTER, J.W. The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5683-5691, 1996.

HELMS, M.; SIMONSEN, J.; MOLBAK, K. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 498-506, 2006.

HENGGE-ARONIS, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p.373-395, 2002.

HENNESSY, T.W.; HEDBERG, C.W.; SLUTSKER, L.; WHITE, K.E.; BESSER-WIEK, J.M.; MOEN, M.E.; FELDMAN, J.; COLEMAN, W.W.; EDMONSON, L.M.; MacDONALD, K.L.; OSTERHOLM, M.T. A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream: the investigation team. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 20, p. 1281-1286, 1996.

HEYNDRICKX, M.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. Recent changes in *Salmonella* nomenclature: the need for clarification. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 275-277, 2005.

HUFFMAN, R.D. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. **Meat Science**, v. 62, p. 285-294, 2002.

JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp. ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994-1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n.1, p. 47-51, 1999.

JEFFREYS, A.G.; HAK, K.M.; STEFFAN, R.J.; FOSTER, J.W.; BEJ, A.K. Growth, survival and characterization of *cspA* in *Salmonella enteritidis* following cold shock. **Current Microbiology**, v. 36, p. 29-35, 1998.

JONGE, R.; RITMEESTER, W.S.; LEUSDEN, V. Adaptive responses of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and other *S. Typhimurium* strains and *Escherichia coli* O157:H7 to low pH environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 625-632, 2003.

KANDROR, O.; DeLEON, A.; GOLDBERG, A.L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p. 9727-9732, 2002.

KAPPERUD, G.; STENVIG, H.; LASSEN, J. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* O:4-12 infection in Norway. **American Journal of Epidemiology**, v. 147, n. 8, p. 774-782, 1998.

KHAKHRIA, R.; WOODWARD, D.; JOHNSON, W.M.; POPPE, C. *Salmonella* isolated from humans, animals and other sources in Canada, 1983-92. **Epidemiology and Infectious**, v. 119, p. 15-23, 1997.

KOUTSOMANIS, K.P.; SOFOS, J.N. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* after habituation at different pH conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 321-326, 2004.

LANDGRAF, M.; GONÇALVES, J.A.; FALCÃO, D.P. Surto de toxinfecção alimentar por *Salmonella* Bredeney. **Revista de Saúde Pública**, v. 19, p. 92-93, 1985.

LÁZARO, N.; TIBANA, A.; HOFER, E. *Salmonella* spp. in healthy swine and in abattoir environments in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9, p. 1029-1033, 1997.

LE BACQ, F.; LOUWAGIE, B.; VERHAEGEN, J. *Salmonella typhimurium* and *Salmonella Enteritidis*: changing epidemiology from 1993 until 1992. **European Journal of Epidemiology**, v. 10, n. 4, p. 367-371, 1994.

LE MINOR, L.; POPOFF, M.Y. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic of Bacteriology**, v. 37, p. 465-468, 1987.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p.181-186, 2000.

LEYER, G.J.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2075-2080, 1992.

LEYER, G.J.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p.1842-1847, 1993.

LEYER, G.J.; WANG, L.L.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3752-3755, 1995.

LIMA, E.S.C.L. **Avaliação microbiológica em carcaças suínas e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) em um frigorífico em Minas Gerais**. 2002. 51 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

LIMA, E.S.C.L.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, J.L.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; ALMEIDA, L.P.; PINTO, M.S.; DIAS, F.S. Isolamento de *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). **Pesquisas Veterinárias Brasileiras**, v. 24, n. 4, p.185-190, 2004.

LIN, J.; LEE, I.S.; SLONCZEWSKI, J.L.; FOSTER, J.W. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 4097-4104, 1995.

LO FO WONG, D.M.A.; HALD, T.; VAN DER WOLF, P.J.; SWANEMBURG, M. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Production Science**, v. 76, p. 215-222, 2002.

LOU, Y.; YOUSEF, A.E. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1252-1255, 1997.

MARTINSEN, T.C.; BERGH, K.; WALDUM, H.L. Gastric juice: a barrier against infectious diseases. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, p. 94-102, 2005.

MATTICK, K.L.; JORGENSEN, F.; LEGAN, J.D.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; HUMPHREY, T.J. Habituation of *Salmonella* spp. at reduced water activity and its effect on heat tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4921-4925, 2000.

MATTICK, K.L.; JORGENSEN, F.; WANG, P.; POUND, J.; VANDEVEN, M.H.; WARD, L.R.; LEGAN, J.D.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; HUMPHREY, T.J. Effect of challenge temperature and solute type on heat tolerance of *Salmonella* serovars at low water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4128-4136, 2001.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infections Diseases**, v. 5, n. 5, p. 607-625, 1999.

MENDES, R.A. **Efeito de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento e sobrevivência de *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp.** 2005. 51 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MILLER, L.G.; KASPAR, C.W. *Escherichia coli* O 157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 460-464, 1994.

MILLER, S.I.; PEGUES, D.A. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2000. p. 2344-2353.

MISHU, B.; KOEHLER, J.; LEE, L.A.; RODRIGUE, D.; BRENNER, F.H.; BLAKE, P.; TAUXE, R.V. Outbreaks of *Salmonella enteritidis* infections in the United States, 1985-1991. **Journal of Infectious Diseases**, v. 169, n. 3, p. 547-552, 1994.

MIYAMOTO, T.; HORIE, T.; BABA, E.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 350-353, 1998.

MORTON, R.D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 63-67.

NETTEN, P.V.; MOSSEL, D.A.A.; IN'T VELD, J.H. Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses: a pilot plant study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 1-9, 1995.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Reviews Medicine**, v. 52, p. 259-274, 2001.

PANOFF, J.M.; THAMMAVONGS, B.; GUÉGUEN, M.; BOUTIBONNES, P. Cold stress responses in mesophilic bacteria. **Cryobiology**, v. 36, p. 75-83, 1998.

PARK, Y.K.; BEARSON, B.; BANG, S.H.; BANG, I.S.; FOSTER, J.W. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v. 20, p. 605-611, 1996.

PATRICK, M.E.; ADOOCK, P.M.; GOMEZ, T.M.; ALTEKRUSE, S.F.; HOLLAND, B.H.; TAUXE, R.V.; SWERDLOW, D.L. *Salmonella* Enteritidis infections in United States, 1985-1999. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2004.

PEARCE, R.A.; BOLTON, D.J.; SHERIDAN, J.J.; McDOWELL, D.A.; BLAIR, I.S.; HARRINGTON, D. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 331-339, 2004.

PHADTARE, S.; ALSINA, J.; INOUE, M. Cold-shock response and cold-shock proteins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 175-180, 1999.

PIPEK, P.; HOUSKA, M.; HOKE, K.; JELENKOVA, J.; KYHOS, K.; SIKULOVA, M. Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 224-231, 2006.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars**. 8.ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* Institut Pasteur, 2001.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W.; GHEESLING, L.L. Supplement 2000 (n. 44) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 907-909, 2001.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2001 (n. 45) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 173-174, 2003.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (n. 47) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 568-570, 2004.

PRICE, S.B.; WRIGHT, J.C.; DEGRAVES, F.J.; CASTANIE-CORNET, M.P.; FOSTER, J.W. Acid resistance systems required for survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4792-4799, 2004.

QUINTAVALLA, S.; LARINI, S.; MUTTI, P.; BARBUTI, S. Evaluation of the thermal resistance of different *Salmonella* serotypes in pork meat containing curing additives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 107-114, 2001.

RABSCH, W.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M.; KINGSLEY, R.A.; HINZ, K.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A.J. Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, p. 443-448, 2000.

RAJ, H.; LISTON, J. Survival of bacteria of public health significance in frozen seafoods. **Food Technology**, v. 15, p. 429-434, 1961.

REEVES, M.W.; EVINS, G.M.; HEIBA, A.A.; PLIKAYTIS, B.D.; FARMER III, J.J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 313-320, 1989.

ROERING, A.M.; LUCHANSKY, J.B.; IHNOT, A.M.; ANSAY, S.E.; KASPAR, C.W.; INGHAM, S.C. Comparative survival of *Salmonella typhimurium* DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 263-269, 1999.

RUSSELL, N.J. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 27-34, 2002.

RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 185-193, 1998.

SAMELIS, J.; IKEDA, J.S.; SOFOS, J.N. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT 104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 563-575, 2003.

SHARMA, M.; ADLER, B.B.; HARISSON, M.D.; BEUCHAT, K. Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 448-453, 2005.

SILVA, J.O.; CAPUANO, D.M.; TAKAYANAGUI, O.M.; GIACOMETTI JÚNIOR, E. Enteroparasitoses e onicomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 8, n. 4, p. 385-392, 2005.

SMALL, P.; BLANKENHORN, D.; WELTY, D.; ZINSER, E.; SLONCZEWSKI, J.L. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 6, p. 1729-1737, 1994.

ST. LOUIS, M.E.; MORSE, D.L.; POTTER, M.E.; DeMELFI, T.M.; GUZEWICH, J.J.; TAUXE, R.V.; BLAKE, P.A. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. New implications for the control of salmonellosis. **Journal of American Medical Association (JAMA)**, v. 259, n. 14, p. 2103-2107, 1988.

STOPFORTH, J.D.; YOON, Y.; BARMPALIA, I.M.; SAMELIS, J.; SKANDAMIS, P.N.; SOFOS, J.N. Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 309-319, 2005.

TAMPLIN, M.L. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated human gastric fluid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 320-325, 2005.

TAMPLIN, M.L.; FEDER, I.; PALUMBO, S.A.; OSER, A.; YODER, L.; LUCHANSKY, J.B. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* biotype I on swine carcasses processed under the hazard analysis and critical control point-based inspection models project. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 9, p. 1305-1308, 2001.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, p. 315-322, 1996.

THIAGARAJAN, D.; SAEED, A.M.; ASEM, E.K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. **Poultry Science**, v. 73, n. 1, p. 89-98, 1994.

TINDALL, B.J.; GRIMONT, P.A.D.; GARRITY, G.M.; EUZÉBY, J.P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 521-524, 2005.

TIWARI, R.P.; SACHDEVA, N.; HOONDAL, G.S.; GREWAL, J.S. Adaptive acid tolerance response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 137-146, 2004.

TOSUN, H.; GÖNÜL, S.A. Survival of acid adapted *Salmonella typhimurium* in some acidic foods. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 27, p. 31-36, 2003.

ULJAS, H.E.; INGHAM, S.C. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in synthetic gastric fluid after cold and acid habituation in apple juice or trypticase soy broth acidified with hydrochloric acid or organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 939-947, 1998.

VAN DER GAAG, M.A.; SAATKAMP, H.W.; BACKUS, G.B.C.; BECK, P.V.; HWIRNE, R.B.M. Cost-effectiveness of controlling *Salmonella* in the pork chain. **Food Control**, v. 15, p. 173-180, 2004.

VOETSCH, A.C.; VAN GILDER, T.J.; ANGULO, F.J.; FARLEY, M.M.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; CIESLAK, P.R.; DENEEN, V.C.; TAUXE, R.V. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 127-143, 2004.

WATERMAN, S.R.; SMALL, P.L.C. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3882-3886, 1998.

YOUSEF, A.E., COURTNEY, P.D. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. In: YOUSEF, A.E.; JUNEJA, V.K. **Microbial stress adaptation and food safety**. Washington: CRC Press, 2002. p. 1-30.

YOUSEF, A.E.; JUNEJA, V.K. **Microbial stress adaptation and food safety**. Washington: CRC Press, 2002. 369 p.

ZHAO, C.; GE, B.; VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D.G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., Area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5431-5436, 2001.

ANEXO

ANEXO

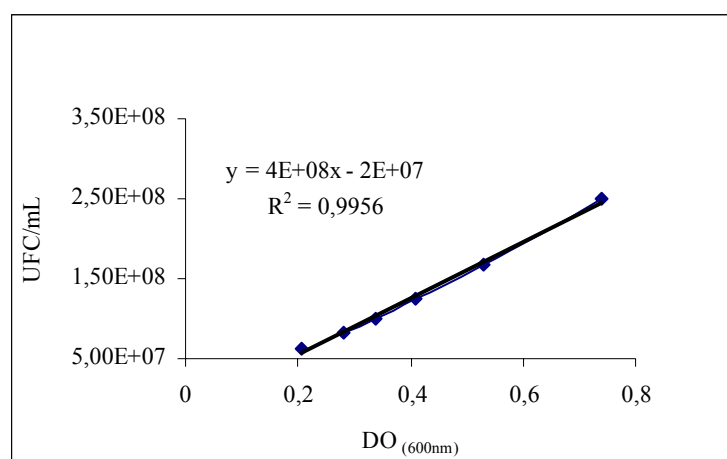


Figura 1A – Curva de calibração de *Salmonella*.

Tabela 1A – Análise de variância

Refrigeração na sobrevivência	FV	GL	QM	Congelamento na sobrevivência	FV	GL	QM
	Bac	1	6,07E-02 *		Bac	1	6,40E-02 **
	pH	3	6,70E-04 ^{NS}		pH	3	6,97E-03 ^{NS}
	Bac x pH	3	1,04E-02 ^{NS}		Bac x pH	3	1,76E-02 ^{NS}
	Resíduo A	16	1,03E-02		Resíduo A	16	1,40E-02
	PR	4	1,62E-02 ***		PC	4	8,99E-02 ***
	PR x Bac	4	4,13E-03 ^{NS}		PC x Bac	4	5,20E-03 ^{NS}
	PR x pH	12	2,76E-03 ^{NS}		PC x pH	12	1,56E-03 ^{NS}
	PR x Bac x pH	12	2,19E-03 ^{NS}		PC x Bac x pH	12	2,47E-03 ^{NS}
	Resíduo B	64	2,28E-03		Resíduo B	64	2,56E-03
	CV (%)		4,61		CV (%)		5,60
FGS na sobrevivência da CCS3 (Refrigeração)	FV	GL	QM	FGS na sobrevivência da ATCC (refrigeração)	FV	GL	QM
	Ph	3	4,67E-01 ^{NS}		pH	3	6,04E-02 ^{NS}
	Resíduo A	8	1,49E-01		Resíduo A	8	3,39E-02
	PR	4	1,12E-01 ^{NS}		PR	4	7,09E-02 ^{NS}
	PR x pH	12	5,06E-02 ^{NS}		PR x pH	12	5,28E-02 ^{NS}
	Resíduo B	32	3,49E-02		Resíduo B	32	4,55E-02
	PFGS	9	3,25E-01 ***		PFGS	3	1,13E+01 ***
	PFGS x pH	27	8,36E-03 ***		PFGS x pH	9	1,37E-02 ^{NS}
	PFGS/pH 4,0	3	8,95E-02 ***		PFGS x PR	12	2,23E-02 ^{NS}
	PFGS/pH 4,5	3	2,25E-01 ***		PFGS x PR x pH	36	1,26E-02 ^{NS}
	PFGS/pH 5,0	3	4,42E-01 ***		Resíduo C	120	1,40E-02
	PFGS/pH 7,2	3	2,94E-01 ***				
	PFGS x PR	36	2,08E-03 ^{NS}				
	PFGS x PC x pH	108	2,27E-03 ^{NS}				
Resíduo C	360	2,16E-03					
CV (%)		5,72	CV (%)		32,01		
FGS na sobrevivência da CCS3 (congelamento)	FV	GL	QM	FGS na sobrevivência da ATCC (Congelamento)	FV	GL	QM
	pH	3	3,42E-01 ^{NS}		pH	3	1,35E-02 ^{NS}
	Resíduo A	8	1,28E-01		Resíduo A	8	3,43E-02
	PC	4	3,35E-02 ^{NS}		PC	4	2,06E-02 ^{NS}
	PC x Ph	12	5,10E-02 ^{NS}		PC x pH	12	1,30E-02 ^{NS}
	Resíduo B	32	3,55E-02		Resíduo B	32	1,20E-02
	PFGS	9	2,13E-01 ***		PFGS	3	1,21E+01 ***
	PFGS x pH	27	7,71E-03 ***		PFGS x pH	9	1,73E-02 *
	PFGS/pH 4,0	3	6,90E-02 ***		PFGS/pH 4,0	3	3,24E+00 ***
	PFGS/pH 4,5	3	1,12E-01 ***		PFGS/pH 4,5	3	2,93E+00 ***
	PFGS/pH 5,0	3	3,66E-01 ***		PFGS/pH 5,0	3	3,03E+00 ***
	PFGS/pH 7,2	3	1,60E-01 ***		PFGS/pH 7,2	3	3,19E+00 ***
	PFGS x PC	36	1,30E-03 ^{NS}		PFGS x PC	12	1,32E-02 ^{NS}
	PFGS x PC x pH	108	1,11E-03 ^{NS}		PFGS x PC x pH	36	1,13E-02 ^{NS}
Resíduo C	360	1,62E-03	Resíduo C	120	7,96E-03		
CV (%)		4,71	CV (%)		30,00		

FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; Bac = bactéria; PR = período de resfriamento; PC = período de congelamento; PFGS = período de exposição ao Fluido Gástrico Simulado (FGS).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ^{NS} não-significativo.