

Correlação entre contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus*

Correlation between aerobic mesophilic heterotrophic bacterial count and isolation of *Salmonella* spp. in raw hamburgers

Jorge Luiz Fortuna, ** Elmiro Rosendo do Nascimento, *** Robson Maia Franco***

Resumo

Objetivou-se correlacionar a Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e o isolamento de *Salmonella* spp. em hambúrgueres. Foram coletadas e analisadas 80 amostras de hambúrgueres. Realizou-se a contagem total de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas através do método de semeadura em profundidade (*pour plate*) e isolamento de *Salmonella* spp. através de microbiologia convencional. Também se utilizou o coeficiente de correlação de Spearman (r_s) para verificar o grau de dependência entre os valores encontrados nas amostras analisadas. Não houve correlação significativa em relação à contaminação dos hambúrgueres pela *Salmonella* spp. e as altas contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas.

Palavras-chave: bactérias aeróbias mesófilas; *Salmonella*; hambúrguer; correlação.

Abstract

The objective was to correlate the aerobic mesophilic heterotrophic bacterial count and isolation of *Salmonella* spp. in hamburgers. There were collected and analyzed 80 samples of hamburgers. It was carried out the total of aerobic mesophilic heterotrophic bacterial count bacteria by pour plate and isolation of *Salmonella* spp. by standard microbiology. Further, the Spearman correlation coefficient was used to verify the degree of dependence between the values found in the samples analyzed. There was no significant correlation of hamburgers contamination by *Salmonella* spp. and high counts of aerobic mesophilic heterotrophic bacterial.

Keywords: Aerobic Mesophilic; bacteria; *Salmonella*; hamburger; correlation.

Introdução

O hambúrguer é um alimento muito apreciado, principalmente pela praticidade do seu preparo e por ser um alimento com ótimas características sensoriais. Contudo, há uma grande possibilidade de haver algum tipo de contaminação da sua principal matéria-prima, a carne, desde o abate (carcaça), manipulação, armazenamento, até o seu preparo e consumo.

O hambúrguer é um produto cárneo industrializado, obtido da carne moída de animais de açougue, com adição ou não de tecido adiposo e outros ingredientes (Brasil, 2000). Sendo um produto submetido a um processo de manipulação excessiva com problemático sistema de conservação, favorecendo sua contaminação por patógenos. Conseqüentemente, torna-se necessária a avaliação de sua qualidade higiênico-sanitária do ponto de vista microbiológico a fim de garantir que o consumo ocorra de forma segura e livre de contaminação.

A contagem padrão em placas de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) indica a qualidade higiênico-

sanitária dos alimentos. Silva et al. (2007) descreveram que, ao usar esta técnica, não se diferenciam os tipos de bactérias, sendo utilizadas para a obtenção de informações sobre a qualidade de produtos, práticas de fabricação, qualidade das matérias-primas utilizadas, condições de processamento, qualidade de manipulação e validade comercial do produto, tornando-se útil na avaliação da qualidade do produto, pois populações altas de bactérias podem estar relacionadas com as deficiências e/ou falha na sanitização, no controle do processo ou na qualidade dos ingredientes.

Não há legislação em relação ao padrão microbiológico para CBHAM em hambúrgueres. Porém, Silva et al. (2007) e Morton (2001) descreveram que o número máximo dessa microbiota, em carne moída crua, não deve ultrapassar $1,0 \times 10^5$ UFC/g.

O gênero *Salmonella* representa um dos mais importantes grupos de bactérias patogênicas presentes nos alimentos, principalmente os de origem animal, e um dos principais responsáveis por causar infecções alimentares. Além disso, os surtos de doenças alimentares constituem um desafio

* Recebido em 20 de setembro de 2012 e aceito em 23 de fevereiro de 2013.

** Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Laboratório de Microbiologia. Campus X. Curso de Ciências Biológicas. Av. Kaikan, s/n – Universitário. Teixeira de Freitas-BA. CEP 45995-300. Brasil. Tel: 55(73)32638071. Fax: 55(73)32638054; e-mail: jfortuna@uneb.br. Programa de Pós-Graduação (Doutorado) de Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal Fluminense (UFF).

*** Universidade Federal Fluminense (UFF). Faculdade de Veterinária. Niterói-RJ. Brasil. Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

às indústrias alimentícias e aos órgãos de saúde, sendo o hambúrguer, tanto de carne bovina quanto o misto (carne bovina e de frango), um dos alimentos mais frequentemente relacionados a estes surtos. Essas infecções alimentares, relacionadas com este produto, principalmente causadas por *Salmonella* spp., são denominadas salmoneloses.

Salmonella spp. são bactérias patogênicas importantes para a indústria alimentar, sendo um dos micro-organismos significativos causadores de infecção alimentar (Siqueira et al., 2003), além de ser uma das principais bactérias veiculadas por alimentos responsável pela ocorrência de doenças que ocasionam perdas econômicas em todo o mundo (Giombelli e Silva, 2002). São micro-organismos que invadem a membrana mucosa do trato intestinal, e são transmitidos de forma fecal-oral aos seres humanos principalmente através da água, da carne, dos ovos e dos produtos das aves domésticas contaminados. A infecção por *Salmonella* spp. é uma doença gastrointestinal, sendo mais frequentemente transmitida dos outros animais aos seres humanos (D'Aoust, 1991; Ferretti et al., 2001; Kwang et al., 1996; Riyaz-UI-Hassan et al., 2004). Van Pouke (1990) afirmou que a infecção por *Salmonella* spp. é resultado da ingestão do alimento ou da água contendo números suficientes destas bactérias que alcançam e invadem o intestino delgado, sendo que os principais sintomas clínicos incluem a gastroenterite aguda, bacteremia, com ou sem infecção extraintestinal, febre, e até um estado assintomático do portador.

Os limites de tolerância máxima e padrões microbiológicos para hambúrgueres são estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2001), sendo que para amostra indicativa ou amostra representativa, o alimento deve estar totalmente ausente de células bacterianas de *Salmonella* spp.

Neste trabalho objetivou-se correlacionar a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM) e o isolamento de *Salmonella* spp. em hambúrgueres comercializados no comércio formal do município de Niterói-RJ.

Material e método

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), onde foram analisadas 80 amostras de hambúrgueres, sendo 40 de carne bovina e 40 de hambúrgueres misto (carne bovina e carne de frango) que eram comercializados embalados individualmente em cartuchos de polipropileno duplos ou simples, com peso individual variando de 56g a 120g, coletadas no comércio formal (supermercados e/ou açougues) do município de Niterói-RJ, no período de maio a dezembro de 2011. Sendo assim, um conjunto de quatro hambúrgueres foi considerado uma unidade amostral. Os hambúrgueres foram adquiridos através de compra direta nos estabelecimentos comerciais, sendo a escolha do produto realizada de forma aleatória. As amostras foram coletadas na própria embalagem original, sendo armazenadas individualmente em sacos de polietileno de baixa densidade com fecho hermético, mantidas em recipiente isotérmico portátil, com gelo, até a chegada ao laboratório onde foram realizadas as análises.

A partir das diluições de Água Peptonada (AP) transferiram-se alíquotas de 1,0 mL em uma placa de Petri para cada diluição (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}), respectivamente, onde verteu-se de

15 a 20 mL do meio Ágar Padrão para Contagem (APC) – método de semeadura em profundidade (“pour plate”). Após a homogeneização, e solidificação do meio, as placas foram incubadas, em posição invertida, em estufa com temperatura de 35°C/24-48 horas para a contagem total de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (Silva et al., 2007; Morton, 2001; Siqueira, 1995).

O método empregado para a análise microbiológica de isolamento e identificação de *Salmonella* spp. foi baseado na Instrução Normativa (IN) n° 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), que oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal (Brasil, 2003).

Para a etapa do pré-enriquecimento foi pesada, em balança digital de precisão, e em saco para homogeneização, 25g da amostra na qual foram adicionados 225 mL de Solução Salina Peptonada Tamponada 1% (SSPT). Após, foi homogeneizado por 60 segundos no “Stomacher” em velocidade normal. Fechou-se hermeticamente o saco contendo a amostra e a SSPT e deixou-se em repouso por uma hora em temperatura ambiente antes de ser colocado em estufa à temperatura de 36°C/16-20 horas.

Na fase do enriquecimento, a partir do procedimento do pré-enriquecimento, foram inoculados, simultaneamente para cada amostra, nos meios líquidos seletivos, Caldo Selenito Cistina (SC) e Caldo Tetracionato (TT). Foram transferidas assepticamente alíquotas de 1,0 mL para tubo contendo 10,0 mL de Caldo SC e 1,0 mL para tubo contendo 10,0 mL de Caldo TT. Todos foram incubados em banho-maria a 41°C/24-30 horas.

O plaqueamento seletivo ocorreu a partir dos caldos seletivos de enriquecimento, onde repicou-se sobre a superfície previamente seca de placas de Petri com cada meio sólido seletivo de escolha, estriando de forma a se obter UFC isoladas com o auxílio de alça bacteriológica. Foram obtidas duas placas para cada meio de cultura de escolha, uma originária do Caldo SC e outra do Caldo TT. Os meios sólidos escolhidos foram: Ágar Hektoen (HE); Ágar *Salmonella-Shigella* (SS); Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar *Salmonella* Diferencial (ASD). Todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C/18-24 horas.

Na fase da triagem, aqui denominada de triagem primária, foram escolhidas até três UFC típicas de cada placa de Petri do plaqueamento seletivo, que foram repicadas para dois diferentes tubos contendo, respectivamente, Ágar Três Açúcares Ferro (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA), que foram incubados em estufa bacteriológica a 36°C/24-30 horas. Após o tempo de incubação, foram escolhidos os respectivos pares dos tubos de TSI e LIA com leituras fenotípicas características para o gênero *Salmonella*, com ou sem produção de H₂S. Tubos TSI/LIA típicos apresentavam-se com as seguintes características: TSI com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho) e LIA com fundo e bisel alcalino (púrpura). Tubos TSI/LIA atípicos 1: TSI com fundo e bisel ácido (amarelo) e LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura). Tubos TSI/LIA atípicos 2: TSI com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho) e LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura). Os tubos TSI/LIA que foram descartados apresentavam as seguintes características: TSI com fundo e bisel ácido (amarelo) e LIA com fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (púrpura).

A partir dos tubos utilizados na triagem primária (TSI e LIA), com leituras do meio de cultura típico, atípico 1 e atípico 2 para *Salmonella* spp., iniciou-se a triagem secundária (provas bioquímicas complementares). Foram repicados, utilizando a agulha bacteriológica, transferindo colônias para tubos contendo meios de cultura que evidenciaram as propriedades fisiológicas e metabólicas das culturas suspeitas por meio da verificação da produção da Urease (Caldo Ureia) e desaminação da Fenilalanina (Ágar Fenilalanina). Esta fase tornou-se importante para que se diferenciasses células bacterianas de *Proteus* spp., que são Urease positiva (hidrolisam a Ureia) e desaminam a Fenilalanina, de células bacterianas de *Salmonella* spp.

Para o teste da produção da Urease semeou-se maciçamente colônias em tubos de ensaio contendo 3,0 mL de Caldo Ureia e incubou-se a 36°C/24-30 horas. Foi observada a coloração do meio. A manutenção da cor inicial do meio indicou que não ocorreu hidrólise da ureia. A alteração para rosa foi indicativa de alcalinização do meio devido à ação da urease sobre a Ureia. A *Salmonella* spp. não produz a Urease. No teste da desaminação da Fenilalanina inoculou-se a superfície do bisel do Ágar Fenilalanina por estriamento e incubou-se a 36°C/18-24 horas. Para a leitura, foram adicionadas duas a três gotas de solução de Cloreto Férrico a 10%. A alteração de coloração da cultura na superfície do bisel para verde indicou reação de desaminação da Fenilalanina. *Salmonella* spp. não desamina a Fenilalanina.

A partir dos resultados negativos do teste da produção da Urease e da desaminação da Fenilalanina, característicos de células bacterianas de *Salmonella* spp., foram repicadas colônias dos tubos de TSI correspondentes para Ágar Nutriente inclinado e incubadas a 36°C/18-24 horas, para a prova de sorologia (sorologia). Após a incubação, a partir destes cultivos em Ágar Nutriente inclinado, ressuspendeu-se o cultivo obtido em aproximadamente 2,0 mL de Solução Salina 0,85%. Em lâmina de vidro foram depositadas separadamente uma gota de Solução Salina 2% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente O, diretamente do frasco. Em seguida, acrescentou-se a cada uma delas uma gota da suspensão teste. Com movimentos circulares, realizou-se a leitura com iluminação sobre o fundo escuro em um a dois minutos, classificando a reação do seguinte modo: positiva (presença de aglutinação somente na mistura cultivo mais antissor); negativa (ausência de aglutinação em ambas as misturas); e não específica (presença de aglutinação em ambas as misturas).

Além disso, em cada etapa das análises microbiológicas foram transferidas alíquota da alça de platina dos caldos, além das colônias das placas e tubos, para uma lâmina de vidro para a realização de esfregaço corado pelo método de Gram (características morfotintórias), para a observação de bastonetes Gram-negativos, utilizando-se um microscópio óptico com objetiva de imersão.

Neste estudo utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman (r_s) para verificar o grau de dependência entre os valores encontrados nas amostras analisadas. A incidência de contaminação por *Salmonella* spp. em relação à CBHAM nos hambúrgueres crus analisados foi calculada através da regressão logística simples. Para os cálculos estatísticos utilizou-se o programa estatístico *BioStat 3.0*, versão 2003.

Segundo Ayres et al. (2003), o coeficiente de correlação de Spearman (r_s) é uma prova não paramétrica com a finalidade de determinar o grau de associação entre duas variáveis, pelo

menos, em nível ordinal e dispostas em postos ordenados em duas séries X e Y. A regressão logística simples testa uma variável dependente de Y e uma variável independente, sendo a variável Y binária, ou seja, assume valores 1 (positivo) e valores 0 (negativo).

Resultados e discussão

Os resultados da CBHAM variaram de $3,8 \times 10^3$ UFC/g até $6,5 \times 10^6$ UFC/g, com uma média calculada de $1,8 \times 10^5$ UFC/g. Dos 80 hambúrgueres analisados, 43 (53,75%) tiveram contagem acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g, indicando uma baixa qualidade higiênico-sanitária destes produtos. Dos 40 hambúrgueres de carne bovina, 25 (62,5%) apresentaram contagem acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g e dos 40 hambúrgueres mistos, 18 (45,0%) estavam comprometidos. Na legislação brasileira não consta limites de tolerância para CBHAM, contagem de coliformes a 35°C e contagem total de fungos filamentosos e leveduras para hambúrgueres. Porém, tem sido observado que a CBHAM acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g em carne moída fresca compromete o produto em relação à sua qualidade higiênico-sanitária (Morton, 2001; Silva et al., 2007).

Das 80 amostras de hambúrgueres analisadas, 22 (27,5%) estavam contaminadas por *Salmonella* spp., sendo que destas, oito (36,36%) também apresentavam alta contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM) e 14 (63,64%) com contagem abaixo do ideal. Verificando-se os resultados das análises da CBHAM, constatou-se que das 43 (53,75%) amostras acima do limite ideal, oito (18,6%) também estavam contaminadas por *Salmonella* spp., enquanto 35 (81,4%) encontravam-se livres da contaminação por tal bactéria (Tabela 1).

Tabela 1: Correlação entre os resultados encontrados na contagem padrão de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de *Salmonella* spp. nos hambúrgueres crus analisados

Resultados das Amostras	CBHAM > $1,0 \times 10^5$ UFC/g	CBHAM $\leq 1,0 \times 10^5$ UFC/g	TOTAL
<i>Salmonella</i> spp. +	8	14	22 (27,5%)
<i>Salmonella</i> spp. -	35	23	58 (72,5%)
TOTAL	43 (53,75%)	37 (46,25%)	80 (100%)

CBHAM: Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas

Em pesquisa realizada com um total de 27 amostras de hambúrgueres vendidos na cidade de Maracaibo, Venezuela por Parra et al. (2002), sendo 18 de carne bovina e nove de carne de frango, nove (33,33%) hambúrgueres de carne bovina encontravam-se contaminados por *Salmonella* spp., enquanto a CBHAM apresentou-se muito mais elevada do que o presente estudo, com a média de $1,0 \times 10^{16}$ UFC/g e $2,2 \times 10^{15}$ UFC/g nos hambúrgueres bovinos e de $1,7 \times 10^{13}$ UFC/g nos hambúrgueres de frango.

Ratificando a importância do processamento higiênico-sanitário industrial adequado, pode-se observar a relevância do trabalho realizado por Leal et al. (2008), que analisaram 60 amostras de hambúrgueres de frango, sendo 30 artesanais e 30 industriais, cujo resultados apresentaram alta CBHAM nos

produtos artesanais (média de $2,1 \times 10^7$ UFC/g), enquanto os hambúrgueres industriais apresentaram uma média de $3,5 \times 10^1$ UFC/g. Nesta mesma pesquisa isolou-se *Salmonella* spp. em um (1,66%) hambúrguer, sendo este elaborado de forma artesanal.

Em trabalho experimental realizado por Ramírez et al. (2006), onde foram analisadas 81 amostras de hambúrgueres, armazenados em diferentes temperaturas (-15°C ; 5°C e 15°C) e intervalos de tempo (0 h; 48 h e 96 h), somente uma (1,23%) apresentou contaminação por *Salmonella* spp. A amostra contaminada havia sido armazenada a 15°C por 96 horas, mostrando que este resultado provavelmente se deve ao binômio temperatura-tempo, permitindo que a *Salmonella* spp. possa se multiplicar, caso presente no alimento, ao mesmo tempo em que ocorre diminuição da microbiota contaminante inicial, já que a *Salmonella* spp. é pouco competitiva. A CBHAM foi diminuindo de acordo com o tempo de armazenamento, sendo encontrados os seguintes valores médios de BHAM: $2,1 \times 10^6$ UFC/g (0 h), $1,1 \times 10^6$ UFC/g (48 h) e $4,8 \times 10^5$ UFC/g (96 h).

Tavares e Serafini (2003) verificaram a qualidade de 100 hambúrgueres de carne bovina na cidade de Goiânia, encontrando resultados diferentes a este estudo, que variaram entre a faixa de 10^1 e 10^4 UFC/g, todos inferiores ao valor de $1,0 \times 10^5$ UFC/g, encontrando-se em condições microbiológicas satisfatórias. Porém, estas análises foram realizadas em hambúrgueres prontos para o consumo. Conseqüentemente, a cocção do produto pode ter tido um efeito de decréscimo do número de BHAM. Neste mesmo estudo não foi evidenciada contaminação por *Salmonella* spp.

Carvalho et al. (2005), ao analisarem cinco amostras de hambúrgueres de frango, não encontraram CBHAM acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g, sendo que o valor mínimo encontrado foi de $2,3 \times 10^3$ UFC/g e o valor máximo de $2,5 \times 10^4$ UFC/g, resultado que caracteriza estes produtos com condições apropriadas para o consumo. Porém, Mota et al. (2009) analisaram 15 amostras de sanduíches (pão, hambúrguer, queijo, alface e tomate) comercializados em três redes de *fast-food* e observaram elevada CBHAM em quatro (26,67%) amostras. A contagem total dos produtos variou de $1,0 \times 10^3$ UFC/g a $6,4 \times 10^5$ UFC/g.

No presente estudo, analisando-se os resultados encontrados, sugere-se que a *Salmonella* spp. é um micro-organismo pouco competitivo em alimentos altamente contaminados por outros micro-organismos. Segundo Boni et al. (2011), a capacidade de resistência da *Salmonella* spp. às condições adversas do meio ambiente ou alimento, pode variar tornando-se difícil o isolamento deste micro-organismo, devido à presença de grande número de outras bactérias na amostra e sua reduzida capacidade competitiva na presença de outros patógenos.

Corroborando para este estudo Brant et al. (2007) afirmaram que a ausência de *Salmonella* spp. pode ser determinada pela sua menor capacidade de competição. Em contrapartida, a sua ocorrência em alimentos está, na maioria das vezes, associada às contagens menores de outros contaminantes.

Porém, o valor absoluto do coeficiente de correlação de Spearman (r_s) foi de 0,1606 com o valor crítico absoluto do t

calculado de 1,4375 ($p=0,1545$), sendo menor que os valores tabelados com nível de significância 0,05 e 0,01, mostrando que não houve correlação significativa em relação à contaminação dos hambúrgueres pela *Salmonella* spp. e as altas contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas. Isto é, amostras com alta CBHAM não necessariamente também estarão contaminadas por *Salmonella* spp. e/ou vice-versa.

Tendo em vista o valor de $p=0,2121$ do coeficiente (-0,3671), estatisticamente não há relação entre a contaminação por *Salmonella* spp. e a CBHAM nos hambúrgueres crus analisados (Figura 1). Além disso, a chance de o hambúrguer cru estar contaminado por *Salmonella* spp. é de apenas 0,6927 vezes maior se a CBHAM for elevada. A probabilidade para ocorrer contaminação por *Salmonella* spp. sem ocorrer CBHAM elevada nos hambúrgueres crus analisados foi de 63,90% e para ocorrer contaminação por *Salmonella* spp. com CBHAM elevada foi de 71,88%.

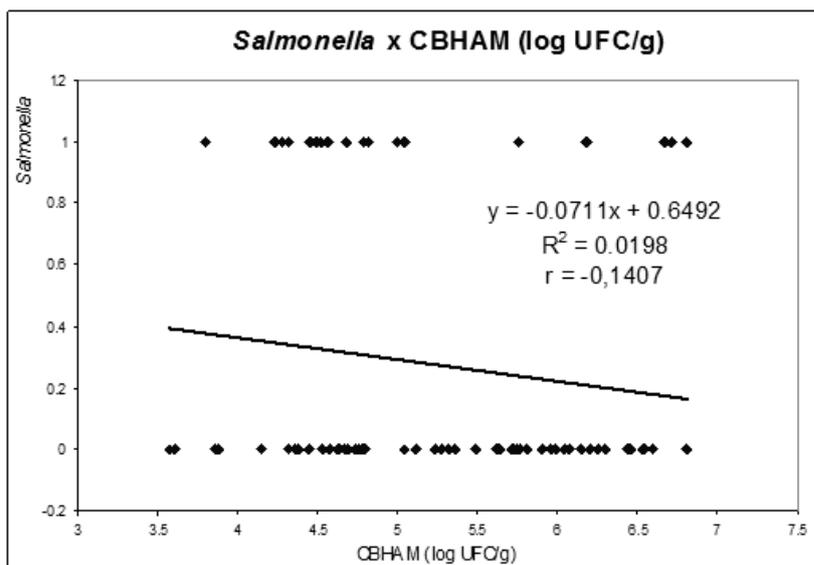


Figura 1: Gráfico de regressão com linha de tendência e valores de coeficiente de determinação (R^2) e correlação (r).

Nascimento et al. (2005) afirmaram que a CBHAM constitui um dos melhores indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos. Sendo assim, este método deveria ser usado para análises microbiológicas de hambúrgueres crus, com o objetivo de identificar deficiências na sanitização, problemas no processamento ou em ingredientes na indústria, a fim de diminuir a carga microbiana do produto cru.

Conclusão

Não houve correlação entre a contagem padrão de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e o isolamento de *Salmonella* spp. nas amostras de hambúrgueres analisadas. Desse modo, não se pode afirmar que a *Salmonella* spp. não é encontrada em alimentos contaminados por alta contagem de outros micro-organismos, pois no caso específico deste trabalho, parte dos hambúrgueres analisados apresentaram alta contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e também contaminação por *Salmonella* ssp.

Referências

- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. *BioEstat 3.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. Brasília: CNPq. 2003, 290 p.
- BONI, H. F. K.; CARRIJO, A. S.; FASCINA, V. B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. v. 12, n. 1, p. 84-95, 2011.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 20*, de 31 de julho de 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almonds, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Instrução Normativa nº 62*, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.
- BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12*, de 2 de janeiro de 2001. Estabelece os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos e Determina os Critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano.
- CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Presença de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. *Arquivos do Instituto Biológico*. v. 72, n. 3, p. 303-307, 2005.
- D'AOUST, J. Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. v. 12, p. 17-40, 1991.
- FERRETTI, R.; MANNAZZU, I.; COCOLIN, L.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 67, n. 2, p. 977-978, 2001.
- GIOMBELLI, A.; SILVA, N. L. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carnes *in natura*. *Revista Higiene Alimentar*. v. 16, n. 95, p. 88-91, 2002.
- KWANG, J.; LITLEDIKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*. v. 22, p. 46-51, 1996.
- LEAL, K. V.; CHAAR, S. A. S.; AYALA, A. B.; ROO, Y. A.; TOLEDO, L. S.; URDANETA, A. G. Comparación de la calidad microbiológica de hamburguesa de pollo elaborada en forma artesanal e industrial. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. v. XVIII, n. 5, p. 624-630, 2008.
- MORTON, R. D. Aerobic plate count. Cap. 7, p. 63-67. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association (APHA). 2001.
- MOTA, J.; TON, N. C.; SIMÕES, J. S.; BELTRAME, M. A. V. Análise microbiológica de sanduíches comercializados em estabelecimentos *fast-food* no município de Vila Velha, ES. *Revista Higiene Alimentar*. v. 23, n. 170/171 (encarte), p. 341-342, 2009.
- NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. Hambúrguer: evolução comercial e padrões microbiológicos. *Boletim CEPPA*. v. 23, n. 1, p. 59-74, 2005.
- PARRA, K.; PIÑERO, M. P.; NARVAÉZ, C.; UZCÁTEGUI, S.; MORENO, L. A.; HUERTA-LEIDENZ, N. Evaluation of microbial and physical-chemistry of frozen hamburger patties expended in Maracaibo, Zulia State, Venezuela. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. v. XII, n. 6, p. 715-720, 2002.
- RAMÍREZ, A. F.; CÓRSER, P. J.; LEAL, K. V. CAGNASSO, M. A.; GONZÁLES, M. P.; URDANETA, A. G. Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento sobre la calidad microbiológica de carne de hamburguesa. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. v. XVI, n. 4, p. 428-437, 2006.
- RIYAZ-UL-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. v. 18, p. 333-339, 2004.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007, 536 p.
- SIQUEIRA, R. S. *Manual de Microbiologia de Alimentos*. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Brasília: EMBRAPA. 1995, 159 p.
- SIQUEIRA, R. S.; DODD, C. E. R.; REES, C. E. D. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 34 (suppl. 1), p. 118-120, 2003.
- TAVARES, T. M.; SERAFINI, A. B. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo *trailers* em Goiânia (GO). *Revista de Patologia Tropical*. v. 32, n. 1, p. 45-52, 2003.
- VAN POUCKE, L. S. G. *Salmonella*-TEK, a rapid screening method for *Salmonella* species in food. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 56, n. 4, p. 924-927, 1990.