

## **Staphylococcus E Salmonella EM ENVOLTÓRIOS NATURAIS SALGADOS DE BOVINOS EMPREGADOS EM EMBUTIDOS\***

*Albenones José de Mesquita \*\**

*Claudio Armando Jürgensen \*\*\**

### **RESUMO**

Foram examinadas bacteriologicamente 35 amostras de envoltório natural salgado de bovino (intestino delgado, intestino grosso, ceco e bexiga) colhidas em frigoríficos com Inspeção Federal, localizados no município de Goiânia-GO.

As enumerações de bactéria do gênero *Staphylococcus* variaram entre  $1,0 \times 10^1$  UFC/g e  $1,0 \times 10^6$  UFGC/g de tripa natural. De 24 isolamentos de bactérias pertencentes a esse gênero, apenas 3 apresentaram características fenotípicas que sugerem a espécie *Staphylococcus aureus*.

Das 35 amostras de envoltório natural examinadas para bactérias do gênero *Salmonella*, apenas uma (ceco) mostrou-se contaminada por esse microrganismo.

### **INTRODUÇÃO**

Dentre as finalidades a que se destinam as tripas de origem animal destacam-se a utilização como envoltório para embutidos, a produção de fios para sutura cirúrgica, cordas para raquetes de tênis e instrumentos musicais. Os intestinos não usados para esses fins são transformados em componentes da ração animal. Entretanto, o uso mais importante e econômico dos intestinos é a preparação de envoltórios naturais.

---

\* Aceito para publicação em outubro/87.

\*\* Professor Adjunto da E. V./UFG.

\*\*\* Professor Titular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal Fluminense.

O processamento tecnológico desse subproduto é feito no próprio estabelecimento de abate, na secção denominada "triparia", ou em indústrias especializadas que o adquirem nos matadouros.

As tripas naturais possuem qualidades como flexibilidade e elasticidade que facilitam o embutimento, assim como favorecem a adaptação à massa do embutido. Sua alta permeabilidade em decorrência dos poros naturais é característica bastante desejável em embutidos defumados, cozidos e escaldados. Embora seja comercializada como subproduto "não comestível", geralmente após o embutimento, é ingerida pelo consumidor juntamente com a massa do embutido, sendo facilmente digerida.

Segundo SCHNEIDER (1953-1954), o processamento tecnológico e a salga tendem a baixar o teor microbiano inicial das tripas; no entanto, quando embutidas, os germes encontram na massa um excelente meio para reprodução, que pode culminar com a deterioração de proteolíticos, ou a simples contaminação do produto.

RICHARDSON *et alii*, citado por HORTON & HEEVER (1972), estudando a microbiota do trato gastrintestinal de animais abatidos em matadouros, encontrou, em pequeno número, os seguintes patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enteropatogênica, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* e outros.

RIHA & SOLBERG (1970), pesquisando a microbiota de tripas ovinas conservadas pelos processos de salga seco e salga úmida isolaram os seguintes gêneros de bactérias nos envoltórios salgados a seco: *Bacillus* (60,5%), *Pseudomonas* (7,9%), *Clostridium* (15,8%), *Micrococcus* (1,6%), e *Gaffkya* (5,3%). Já para as tripas conservadas pela salga úmida foram encontrados os gêneros *Bacillus* (62,3%), *Pseudomonas* (7,5%), *Clostridium* (7,5%), *Micrococcus* (7,5%), *Proteus* (5,6%), *Lactobacillus* (1,9%) e não identificados (5,7%). O subproduto conservado em salmoura apresentou-se, segundo os autores, geralmente mais contaminado do que o salgado a seco.

MURALIDHARA RAO & NANDY (1977), observando somente os microrganismos pertencentes à família **ENTEROBACTERIACEAE** em intestinos de ovinos encontraram as seguintes espécies: *Proteus ruttgeri*, *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Enterobacter liquefaciens*, *Citrobacter intermedium* e *Salmonella enteritidis*. Após uma semana de salga a seco ou em salmoura esses autores não conseguiram isolar nenhuma bactéria da referida família.

Segundo NEUSCHYLZ & LEVETZOW (1972), após 25 dias de salga não houve uma diminuição considerável do número de microrganismos nas tripas. Apenas, após um tratamento com sal durante três meses, deu-se uma re-

dução dos germes numa média de uma potência de dez, onde se destacou, principalmente, o desaparecimento de germes Gram negativos. Enterobacterias não puderam mais ser detectadas após tratamento com sal durante quatro meses.

GABIS & SILLIKER (1974) investigaram vários métodos de eliminação de *Salmonella* em envoltórios naturais de suíno, ovino e bovino inoculados e contaminados naturalmente. Assim, nas tripas de suínos inoculadas, essa bactéria foi efetivamente destruída (99,999%) após a exposição por 24 horas em solução de salmoura saturada a pH 4,0 ou 10,0 ajustados com ácido acético e hidróxido de sódio, respectivamente.

A realização deste trabalho objetivou avaliar através da enumeração de *Staphylococcus* e da pesquisa de *Salmonella*, bactéria de interesse em saúde pública, até que ponto o processamento industrial e o método empregado no preparo das tripas naturais são eficientes na eliminação desses microrganismos.

Pretendeu-se, deste modo, fornecer subsídios à Secretaria de Inspeção de Produto Animal (SIPA) do Ministério da Agricultura e contribuir com a saúde pública, dado o largo emprego dos embutidos na alimentação humana, inclusive crus, considerando o grave risco representado pelas bactérias patogênicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

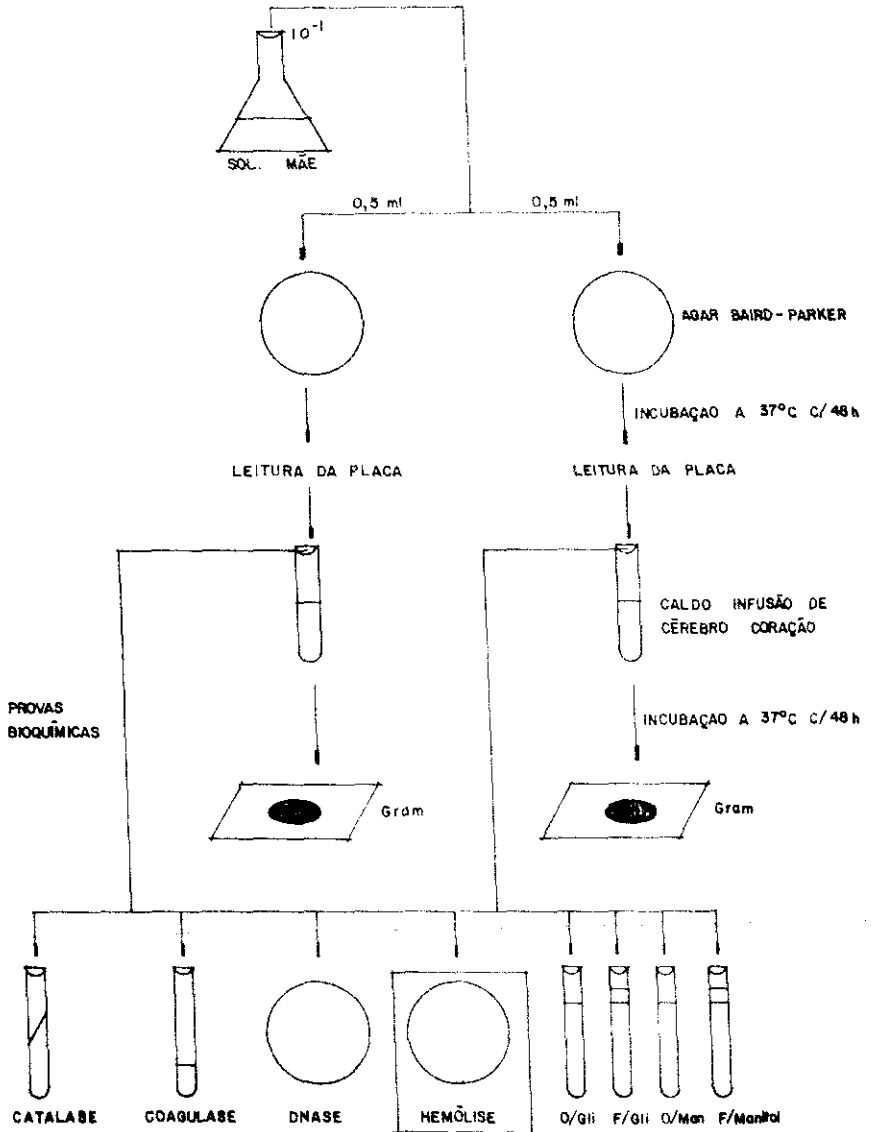
As amostras de tripa salgada de bovino foram adquiridas em frigoríficos com Inspeção Federal localizados no município de Goiânia-GO. Colheram-se 35 amostras do envoltório natural, embaladas em barris de plástico, na sua porção superficial, mantidos à temperatura ambiente, contendo o subproduto em processo de salga a seco, exceto a bexiga cuja salga foi úmida, no intervalo compreendido entre 7 e 30 dias.

As embalagens comerciais, nos depósitos das firmas, foram abertas somente no momento da colheita, realizada com auxílio de pinças anatômicas e tesouras estéreis, colocando-se a tripa em placa de Petri, também estéril. Trabalhou-se dentro de uma técnica asséptica.

De cada amostra, pesou-se, em papel "buffon" estéril, 25 g de tripa. Com auxílio de tesoura e pinça anatômica, o subproduto foi finamente picado em garrafa estéril, no qual também se adicionou aproximadamente 25 ml de caldo lactosado com o indicador de pH púrpura de bromocresol, proveniente de um erlenmeyer com capacidade para 500 ml e contendo justamente 225 ml desse caldo. Com auxílio do pistilo, procedeu-se à homogeneização. Terminada esta fase, todo o conteúdo do garrafa foi vertido para o erlenmeyer. Seguiu-se intensa agitação manual resultando, assim, uma solução mãe de diluição 1/10.

A metodologia adotada para a contagem de *Staphylococcus aureus* foi a recomendada por THATCHER & CLARK (1973), diferindo apenas no se-

### ESQUEMA DA METODOLOGIA EMPREGADA PARA CONTAGEM DE STAPHYLOCOCCUS



guinte: ao invés de usar 0,1 ml de inóculo proveniente de cada diluição, como recomendam esses autores, utilizou-se duas placas de Petri com 0,5 ml de cada uma, como pode ser visto no esquema que se segue.

Todas as colônias morfológicamente diferentes (típicas e atípicas) foram selecionadas e submetidas a provas destinadas a estudar seu comportamento bioquímico, após inoculação em caldo infusão de cérebro-coração\* e incubadas a 37°C por 24 horas.

Dessa cultura de 24 horas fazia-se a coloração pelo método de Gram. Observando-se na leitura formas morfológicas de cocos com coloração positiva para esse método, eram feitas as seguintes provas bioquímicas: Catalase, segundo THATCHER & CLARK (1973); Coagulase, SPERBER & TATINI (1975); DNase, MERCK. E. (1982); Oxidação e Fermentação da Glicose, Oxidação e Fermentação do Manitol e produção de hemólise, MERCK, E. (1982); que sugerem a espécie *Staphylococcus aureus*.

Face à diversidade de métodos de isolamento utilizados para *Salmonella*, procurou-se seguir as recomendações de THATCHER & CLARK (1973), utilizando o meio caldo de Rappaport, na fase de enriquecimento seletivo, em substituição ao caldo selenito – cistina proposto por esses autores, como mostra o esquema a seguir.

Os meios de cultura utilizados no isolamento desta bactéria podem ser observados no Quadro 1.

QUADRO 1 - Meios de cultura empregados na pesquisa de *Salmonella*.

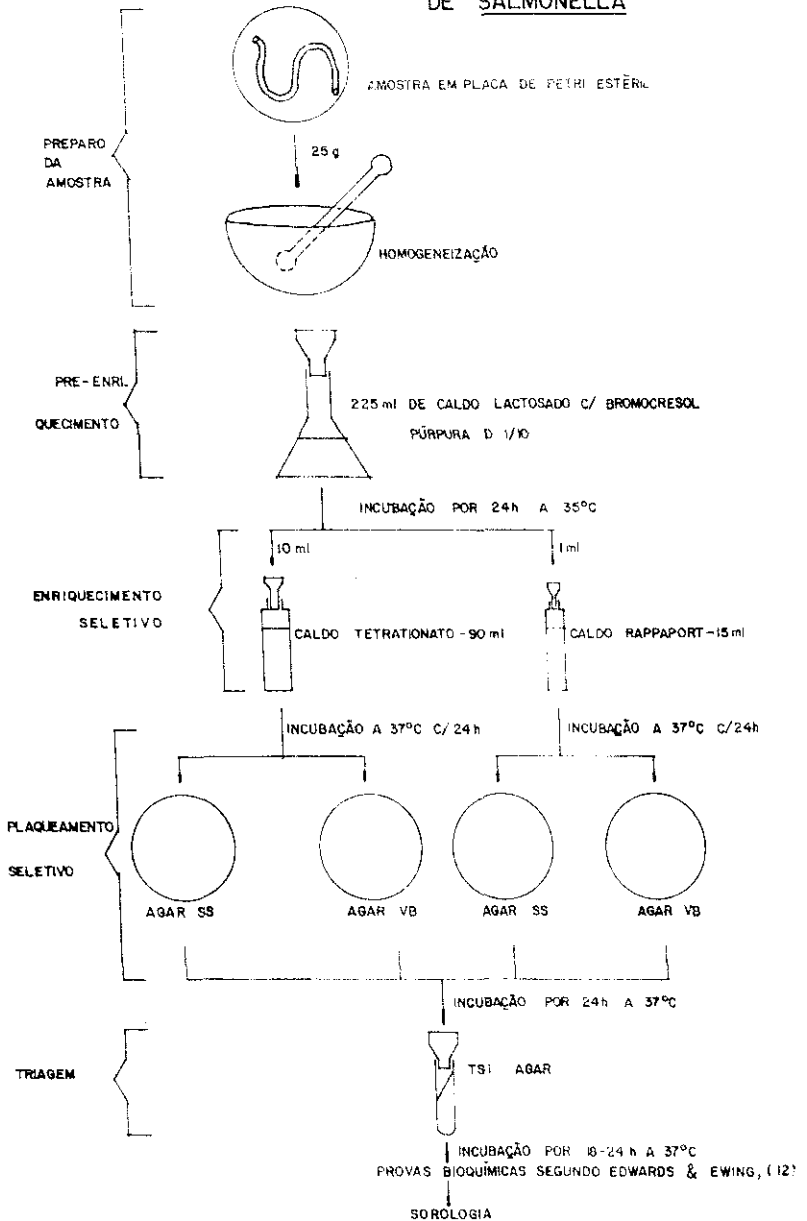
PRÉ ENRIQUECIMENTO	ENRIQUECIMENTO SELETIVO	PLAQUEAMENTO SELETIVO	TRIAGEM	MEIOS PARA PROVAS BIOQUÍMICAS
Caldo lactosado com púrpura de bromocresol. <sup>2</sup>	Caldo Tetrationato base <sup>2</sup>  Caldo Rappaport <sup>2</sup>	<i>Salmonella Shigella</i> agar <sup>2</sup>  Verde brilhante agar <sup>1</sup> .	Tríplice açúcar ferro agar <sup>2</sup>	Caldo tripton <sup>2</sup> MV-VP caldo <sup>2</sup> Dextrose <sup>1</sup> Lactose <sup>1</sup> Sacarose <sup>1</sup> Manitol <sup>1</sup> Caldo uréia <sup>2</sup> Citrato de Simmons agar <sup>2</sup> Lisina descarboxilase agar <sup>2</sup> Caldo ornitina descarboxilase <sup>2</sup> Caldo malonato <sup>2</sup>  Agar motilidade <sup>1</sup>

Legenda: 1 - DIFCO  
2 - MERCK

\* BBL - Manual Products and Laboratory Procedures.

ESQUEMA DA METODOLOGIA EMPREGADA NA PESQUISA

DE SALMONELLA



No Quadro 2 notam-se as características morfológicas das colônias de *Salmonella* nos meios de cultura seletivos utilizados no presente trabalho.

**QUADRO 2 - Características morfológicas das colônias de *Salmonella* em meios de cultura seletivos.**

Meios de Cultura.	Aspectos Morfológicos das Colônias
Salmonella Shigella Agar.	Colônias pequenas transparentes, com ou sem centro negro (H <sub>2</sub> S).
Verde Brilhante Agar.	Colônias e áreas adjacentes ao meio de cultura de coloração avermelhada.

As estirpes selecionadas na fase de triagem eram repicadas para uma série de provas destinadas a estudar o seu comportamento bioquímico de acordo com EDWARDS & EWING (1972). Os resultados obtidos nestas provas, frequentemente, diziam a respeito das bactérias pertencentes aos gêneros *Proteus*, *Citrobacter* e *Salmonella*.

A única amostra com perfil bioquímico de bactéria do gênero *Salmonella* foi submetida a soroaglutinação em lâmina segundo manual DIFCO (1979), aglutinando-se diante do soro polivalente "O". Essa amostra foi enviada à Fundação Instituto Oswaldo Cruz - RJ, para tipificação sorológica, tendo o resultado revelado que pertencia à espécie *Salmonella enteritidis* sorotipo *Salmonella preória* (11:K:1,2).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, são apresentados os resultados das contagens de UFC de *Staphylococcus* e da pesquisa de *Salmonella* nas 35 amostras de envoltórios naturais salgados de bovino (intestino delgado, intestino grosso, ceco e bexiga).

A contagem de bactérias do gênero *Staphylococcus* foi realizada em decorrência de sua tolerância às elevadas concentrações salinas, por ser o *S. aureus* um indicador dos métodos de limpeza e desinfecção utilizado pelas indústrias e, principalmente, pela importância que representa esta bactéria patogênica para saúde pública, uma vez que, pode ser veiculada pela tripa à massa do embutido e determinar em alguns casos, uma intoxicação de origem alimentar no consumidor. Para aumentar a probabilidade de obtenção de contagens em placas de UFC desse gênero, resolveu-se modificar a técnica recomendada por THATCHER & CLARK (1973), já que durante a fase pré-experimen-

tal desse trabalho, não se obtiveram contagens satisfatórias, utilizando como inóculo alíquotas de 0,1 ml provenientes de cada diluição em série, como indica a técnica descrita por esses autores.

A distribuição das amostras de acordo com o grau de contaminação, avaliado através da contagem de *Staphylococcus* por grama do subproduto, encontra-se na Figura 1. Nela está demonstrado com clareza que a bexiga apresentou contagens mais elevadas que os outros tipos de envoltórios. Isto se deveu, provavelmente, ao processo de salga úmida a que foi submetida. RIHA & SOLBERG (1970), observaram que os envoltórios naturais salgados de ovinos conservados pelo processo de salga úmida apresentavam-se, geralmente, mais contaminados do que os submetidos à salga a seco. Esse fato, foi também observado por MURALIDHARA RAO & NANDY (1977), durante as duas primeiras semanas de salga das tripas.

**TABELA 1 - Contagens de UFC de *Staphylococcus* e pesquisa de *Salmonella* em envoltórios naturais salgados de bovinos.**

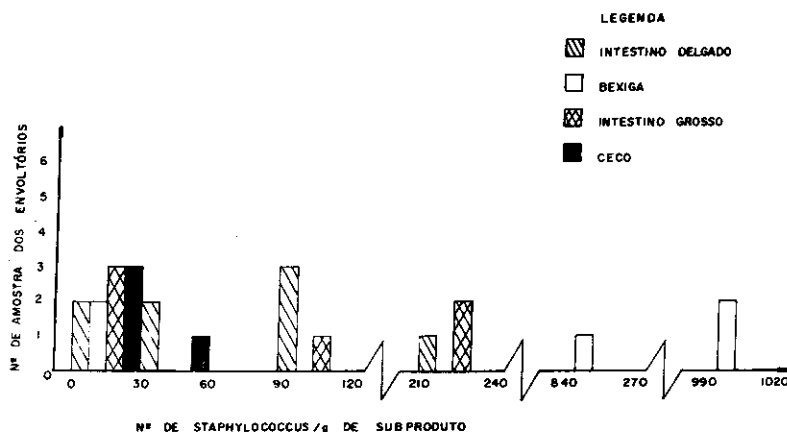
Tipos de Envoltórios	Nº da Amostra	Contagem de UFC <i>Staphylococcus</i> .	Pesquisa de <i>Salmonella</i> .
Intestino Delgado	01	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	02	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	03	$2,2 \times 10^2$	-
	04	$1,1 \times 10^2$	-
	09	$4,0 \times 10^1$	-
	28	$3,0 \times 10^1$	-
	29	$6,0 \times 10^1$	-
	30	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	33	$1,0 \times 10^2$	-
	34	$1,2 \times 10^2$	-
Intestino Grosso	35	$3,0 \times 10^1$	-
	18	$2,3 \times 10^2$	-
	19	$2,0 \times 10^1$	-
	20	$3,0 \times 10^1$	-
	21	$1,0 \times 10^2$	-
	22	$2,2 \times 10^2$	-
	23	$3,0 \times 10^1$	-
	24	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	25	Menor que $1,0 \times 10^1$	-



(Continuação)

Tipos de Envoltórios	Nº da Amostra	Contagem de UFC <i>Staphylococcus</i> .	Pesquisa de <i>Salmonella</i> .
Ceco	05	$3,0 \times 10^1$	+
	07	$4,0 \times 10^1$	-
	10	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	11	$1,0 \times 10^1$	-
	13	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	17	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	26	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	32	$3,0 \times 10^1$	-
Bexiga	06	$8,7 \times 10^2$	-
	08	$3,0 \times 10^1$	-
	12	$1,0 \times 10^1$	-
	14	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	15	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	16	Menor que $1,0 \times 10^1$	-
	27	$1,0 \times 10^3$	-
	31	$1,0 \times 10^3$	-

FIG. 1. DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DOS ENVOLTÓRIOS NATURAIS SALGADOS SEGUNDO O GRAU DE CONTAMINAÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS



As características fenotípicas das 24 espécimes de bactérias da família Micrococcaceae gênero *Staphylococcus* encontradas nas amostras dos envoltórios naturais salgados podem ser observadas na Tabela 2.

**TABELA 2 - Características fenotípicas das amostras de *Staphylococcus*.**

Tipos de Envoltórios	Nº da Amostra	Características fenotípicas					
		Catalase	O/F Glicose	Coagu-lase	O/F Manitol	DNase	Hemólise
Intestino delgado	03	+	+/+	-	-/-	-	-
	04	+	+/+	-	-/-	-	-
	09	+	+/+	-	-/-	-	-
	28	+	+/+	-	-/-	-	-
	29	+	+/+	-	-/-	-	-
	33	+	+/+	-	+/+	-	-
	34	+	+/+	-	+/+	-	-
	35	+	+/+	-	+/+	-	-
Intestino grosso	18	+	+/+	-	-/-	-	-
	19	+	+/+	-	+/+	-	-
	20	+	+/+	-	-/-	-	-
	21	+	+/+	-	-/-	-	-
	22	+	+/+	-	+/+	-	-
	22	+	+/+	-	+/+	+	+
	23	+	+/+	-	-/-	-	-
Ceco	05	+	+/+	-	-/+	-	-
	07	+	+/+	-	-/-	-	-
	11	+	+/+	-	+/+	-	-
	32	+	+/+	-	-/+	-	-
Bexiga	06	+	+/+	+	+/+	+	+
	08	+	+/+	+	+/+	+	+
	12	+	+/+	-	+/+	-	-
	27	+	+/+	-	-/-	-	-
	31	+	+/+	-	-/-	-	-

**Legenda:**

- = Prova Negativa

+ = Prova Positiva

Analisando a Tabela 2, verifica-se que dos 24 isolamentos de bactérias do gênero *Staphylococcus*, apenas as estirpes de nº 6, 8 e 22 apresentaram características fenotípicas que sugerem a espécie *Staphylococcus aureus*.

Esses resultados coincidem parcialmente com os encontrados por RICHARDSON *et alii* citados por HORTON & HEEVER (1972) que encontraram um pequeno número desse patógeno em trato gastrintestinal de bovinos obtidos em matadouros e destinados ao consumo humano.

As Salmoneloses representam um exemplo clássico de infecção alimentar, sendo que os produtos cárneos, principalmente os embutidos crus, constituem uma das mais importantes fontes de contaminação para o homem SINELL (1981). No entanto, é importante salientar que a origem das salmonelas nesses produtos nem sempre é devida a infecção primária (contaminação endógena) dos animais, mas podem ser incorporadas aos alimentos através da manipulação desses portadores humanos sadios durante o processamento tecnológico.

Observando a Tabela 1, verifica-se que apenas a amostra de número cinco mostrou-se contaminada por bactéria do gênero *Salmonella*. Esta amostra revelou, pela tipificação sorológica, pertencer à espécie *Salmonella enteritidis* sorotipo *Salmonella pretoria*. Este achado se reveste de grande importância por ser esta bactéria frequentemente, mas não comumente, isolada de seres humanos o que sugere uma contaminação posterior (exógena). Esse resultado concorda, em parte, com os obtidos por GABIS & SILLIKER (1974), no que se refere ao pequeno número de isolamentos desse patógeno em tripas salgadas, após sete dias de cura. Entretanto, difere frontalmente dos achados desses autores quanto à recuperação de salmonelas após uma semana de salga. Discorda, ainda, dos resultados obtidos por MURALIDHARA RAO & NANDY (1977), que não conseguiram isolar nenhuma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, também após uma semana de salga. NEUSCHYLZ & LEVETZOW (1972), só não conseguiram isolar enterobactérias de tripas naturais após 4 meses de salga. Essa discordância de resultados, provavelmente, foi devida às diferenças existentes nas metodologias empregadas no trabalho bacteriológico e, principalmente, na elaboração do subproduto quando da obtenção e preparo da matéria prima, concentrações salinas utilizadas, temperatura e condições de armazenamento.

## CONCLUSÕES

Em decorrência da importância que representam os envoltórios naturais salgados de bovinos, em relação aos produtos de salsicharia embutidos e de sua potencial capacidade de veicularem bactérias patogênicas e da putrefação à massa desses produtos, mostra-se necessária a adoção de medidas que visem melhorar a sua conservação, bem como a proteção da saúde do consumidor,

pois bactérias patogênicas como *S. aureus* e *Salmonella* podem sobreviver em tripas naturais salgadas no período compreendido entre sete e 30 dias de salga.

### ABSTRACT

#### *Staphylococcus* AND *Salmonella* GENUS IN NATURAL SALTED CASINGS FROM BOVINES USED IN SAUSAGES.

Thirty five samples of natural salted bovine casings collected in federally inspected meat processing plants, located in the municipality of Goiania, Goiás, were examined.

The bacteria count of *Staphylococcus* genus varied between  $1.0 \times 10^1$  UFC/g to  $1.0 \times 10^6$  UFC/g of natural casings. From the 24 bacteria of this genus isolated, only three presented phenotypic characteristics that suggest the species *Staphylococcus aureus*.

From the 35 samples of natural salted bovine casings tested for bacteria of the *Salmonella* genus, only one was contaminated (cecum) by this organism.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BBL Manual products and laboratory procedures (Sixth reprinting in U.S.A.). 1973.
- DIFCO Manual de bacteriologia (Recompilación de técnicas traducción ampliada al espanol de la novena edición del ingles): Mirasa, S. L. Valdemoro, Madrid, 1979.
- EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3ª ed. Burgess publishing Co. Mineapolis, MN. 1972.
- GABIS, D. A. & SILLIKER, J. H. *Salmonella* in natural animal casings. Appl. Microbiology, 27(1): 66-71, 1974.
- MERCK, E. Manual de médios de cultivos. Preparados para microbiologia. Celsu's, 1982.
- MURALIDHARA RAO, N. & NANDY, S. C. Organisms of *Enterobacteriaceae* family associated with animal by products. Indian Jour. of Animal Science, 47(2):344-8, 1977.
- NEUSCHULZ, J. & LEVETZOW, R. Import of froozen intestinos. *Zentral blatt für veterinarmedizin Reihe B*, 19(4):301-8, 1972.
- RICHARSON, N. J.; BURNETT, G. M.; KOORNHOFF, H. J. A bacteriological assesment of meat, offal and other sources of human enteric infections in a Bantu Township. Apud HORTON, B. G. W. & HEEVER, L. W. Van Der. Conversion of bovine digestive tract into hygienically acceptable edible offal. *Jor. South Amer Vet. Med. ass.* 43(3): 251-8, 1972.

RIHA, W. E. & SOLBERG, M. Microflora of fresh pork sausage casings. **Jour. of Food Science**, 35(6):860-3, 1970.

SCHNEIDER, I. S. Aspectos bacteriológicos de produtos embutidos. **Rev. Fac. Med. Vet.** (São Paulo), 5:97-112, 1953-1954.

SINELL, H. J. **Introduccion a la higiene de los alimentos.** Zaragoza, Acribia, 1981. 167 p.

SPERBER, W. H. & TATINI, S. R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *S. aureus* applied microbiology, 29(4):502-5, 1975.

THATCHER, F. C. & CLARK, D. C. Analisis microbiológico de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 1973, 271 p.