U.PORTO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

ATIVIDADE INSPECTIVA E CONTROLO MICROBIOLÓGICO EM TALHOS DO MUNICÍPIO DO PORTO

Joana Andrade Miranda Tenreiro

Orientador
Professor Doutor Paulo Manuel Martins Rodrigues da Costa

Co-Orientador
Dr. Pedro Maria Pacheco da Cunha Osório de Araújo

Porto 2020

U.PORTO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

ATIVIDADE INSPECTIVA E CONTROLO MICROBIOLÓGICO EM TALHOS DO MUNICÍPIO DO PORTO

Joana Andrade Miranda Tenreiro

Orientador
Professor Doutor Paulo Manuel Martins Rodrigues da Costa

Co-Orientador
Dr. Pedro Maria Pacheco da Cunha Osório de Araújo

Porto 2020

Lista de figuras

Figura 1. Ilustração esquemática do sistema de gestão de controlo da segurança alimentar. 3

Lista de fotografias

Fotografia 1. Amostras de carne picada de bovino do talho 12 e 13 12
Fotografia 2. Quantificação de *S. aureus* em meio *Chromagar*. 15
Fotografia 3. Pesquisa de inibidores através de uma prova biológica na amostra de carne picada recolhida no talho 18 18
Fotografia 4- Antibiograma de um MRSA das mãos do operador do talho 11 21

Lista de Quadros

Quadro 1. Periocidade das visitas definida com base no grau de risco.....4
Quadro 2. Caracterização geral dos estabelecimentos 11
Quadro 3. Plano de higienização e controlo microbiológico de superfícies 14
Quadro 4. Controlo físico e microbiológico das amostras de carne picada 17
Quadro 5. Susceptibilidade aos antimicrobianos em *E. coli* isolados obtidos a partir das amostras de carne picada. 19
Quadro 6. Susceptibilidade aos antimicrobianos em *S. aureus* isolados nas mão dos manipuladores.....20
Quadro 7. Temperatura mínima, média e máxima registadas na câmara de refrigeração de cada estabelecimento através de uma monitorização por *dataloggers* (Hanna).....22
Quadro 8. Descrição das áreas de atuação no âmbito das quais os inspectores oficiais são avaliados para efeitos do processo de estandardização norte-americano. 25

Lista de abreviaturas e acrónimos

AMT	Aeróbios Mesófilos Totais
APT	Água Peptonada Tamponada
BP-ovo	*Baird Parker Agar* + gema de ovo
CBVB	Caldo Bilis Verde Brilhante
CE	Comunidade Europeia
cf.	Conforme
Det.	Detergente
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
e.g.	*Exempli gratia*
et al	*et alii*
Ex.	Exemplo
HEA	*Hektoen enteric Agar*
HACCP	*Hazard Analysis and Critical Control Point*
i.e.	*Id est*
MH	*Mueller-Hinton*
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina
MSRV	*Rappaport-Vassiliadis medium semisolid modified*
MVM	Médico Veterinário Municipal
N/D	Não definido
PACE	Plano de Aprovação e Controlo de Estabelecimentos
PCA	*Plate Count Agar*
PNLVERAZ	Programa Nacional de Luta e Vigilância Epidemiológica da Raiva Animal e Zoonoses
SIPACE	Sistema de Informação do Plano de Aprovação e Controlo dos Estabelecimentos
TBX	*Tryptone Bile X-Glucuronide*
TSI	*Triple sugar/iron agar*
TS	*Tryptone Salt*
UFC	Unidades formadoras de colónias
VRBG	*Violet Red Bile Glucose* agar

Resumo

As competências atribuídas à Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) em matéria de higiene e segurança dos géneros alimentícios, visam prevenir, reduzir e eliminar os eventuais riscos para a saúde publica. Nesse sentido, a DGAV elaborou o *Plano de Aprovação e Controlo de Estabelecimentos* que se materializa em visitas regulares aos estabelecimentos industriais, comerciais e outros que laboram produtos de origem animal, incluindo os talhos.

Neste relatório de estágio são descritas as atividades empreendidas no acompanhamento das visitas de controlo realizadas pelo Médico Veterinário Municipal, no âmbito do PACE, em vinte talhos do Município do Porto. Em cada estabelecimento visitado a inspeção baseou-se numa lista *de verificação*, calculando-se um risco estimado de acordo com a atividade e com o grau de cumprimento higio-sanitária. Por forma a complementar as auditorias, considerou-se importante medir alguns parâmetros físicos e realizar o controlo microbiológico sistemático de carnes picadas de bovino, bem como de algumas superfícies em contacto com as mesmas durante o processamento. Para tal, efetuou-se a a quantificação de microrganismos aeróbios totais, *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* coagulase-positivo, bem como a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Em alguns isolados de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* testou-se a sensibilidade antimicrobiana pelo método de *Kirby-Bauer* (método de difusão em disco). No controlo físico, para além da medição do pH, efetuou-se o registo da temperatura da carne picada e das câmaras de refrigeração.

Merece um destaque positivo, o facto de não ter sido detetado qualquer isolado de *L. monocytogenes* ou *Salmonella* spp. nas 20 amostras de carne picada testadas durante este estudo. Assim, todas as amostras avaliadas foram consideradas *Satisfatórias* ao abrigo dos critérios de segurança definidos para as carnes picadas. Porém, 70%, 45% e 95% das análises feitas às superfícies revelaram resultados *Não Satisfatórios* relativamente à quantificação de microrganismos aeróbios totais, de *E. coli* e de *Staphylococcus coagulase*-positivo, respetivamente. Em 58% das amostras recolhidas nas tábuas e facas de corte detetaram-se cargas contaminantes por microrganismos aeróbios totais e/ou *Enterobacteriaceae* superiores ao admissível. Ainda na vertente higiénica, merece preocupação o facto de se ter detetado *Staphylococcus aureus* na maioria das mãos dos manipuladores.

Palavras-chave: controlo oficial; PACE; talhos; carne picada; controlo físico e microbiológico.

Abstract

The competence attributed to the General Direction of Food and Veterinary (DGAV) in matters of hygiene and safety of foodstuffs, aims to prevent, reduce and eliminate any risks to public health. In this sense, DGAV developed the Approval and Control Plan for Establishments, which materializes in regular visits to industrial, commercial and other establishments that work with products of animal origin, including butcheries. This internship report describes the activities undertaken in the monitoring of control visits carried out by the Municipal's Veterinary, within the scope of PACE, in twenty butcheries of Oporto's Municipality. In each establishment visited, the inspection was based on a checklist, calculating an estimated risk according to the activity and the degree of hygiene and sanitary compliance. In order to complement the audits, it was considered important to measure some physical parameters and carry out systematic microbiological control of minced beef, as well as some surfaces in contact with them during processing. To this end, quantification of total aerobic microorganisms, *Enterobacteriaceae* and coagulase-positive *Staphylococcus* was carried out, as well as the search for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. In some isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, antimicrobial sensitivity was tested using the *Kirby-Bauer* method (disk diffusion method). In the physical control, in addition to the pH measurement, the temperature of the minced meat and the refrigeration chambers was recorded. It deserves a positive highlight, the fact that no isolate of *L. monocytogenes* or *Salmonella* spp. in the 20 minced meat samples tested during this study. Thus, all samples evaluated were considered *Satisfactory* under the safety criteria defined for minced meat. However, 70%, 45% and 95% of the analyzes made on surfaces revealed *Unsatisfactory* results regarding the quantification of total aerobic microorganisms, *E. coli* and coagulase-positive *Staphylococcus*, respectively. In 58% of the samples collected on cutting boards and knives, contaminating loads by total aerobic microorganisms and / or *Enterobacteriaceae* were detected higher than the allowable. Still in the hygienic aspect, the fact that *Staphylococcus aureus* was detected in most of the manipulators' hands deserves concern.

Keywords: official control; PACE; butcheries; minced meat; physical and microbiological control

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que apoiaram o meu percurso, em especial, ao Professor Paulo Martins da Costa que me honrou com a sua brilhante orientação, permanente disponibilidade e com pertinentes conselhos académicos e profissionais, sendo para mim um exemplo de académico, com sólidos princípios e valores éticos, profundamente dedicado à ciência e aos seus alunos.

Ao Dr. Pedro Osório pela oportunidade de estágio, acompanhamento "no campo" e disponibilidade sempre demonstrada.

À Dra. Nazaré pelos conhecimentos transmitidos resultantes da sua vasta experiência em campo e preocupação revelada com o exercício competente da sua atividade ("Vocês não vendem pregos, vendem alimentos!")

À D. Elisabete e à Joana Silva pela companhia quase diária no laboratório e tolerância demonstrada nas diversas situações ocorridas de uma inexperiente microbióloga.

À minha família e ao Lourenço pelo apoio, a todos os níveis incansável, sem a qual este trabalho não teria sido possível.

Índice

Lista de figuras ii
Lista de fotografias ii
Lista de Quadros ii
Lista de abreviaturas e acrónimos iii
Resumo iv
Abstract v
Agradecimentos vi
Atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular viii
I. Introdução 1
Médico Veterinário Municipal 1
Plano de Aprovação e Controlo de Estabelecimentos - PACE 2
Lista de verificação 2
Microbiologia Alimentar 4
II. Material e Métodos 6
III. Resultados e Discussão 11
IV. Conclusão 24
V. Referências Bibliográficas 26

Atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular

No decurso do estágio curricular acompanhei o serviço clínico no Canil Municipal do Porto, concretamente nas áreas de profilaxia sanitária (vacinação), identificação eletrónica e gestão de animais errantes recolhidos ao canil.

Na semana de 13 a 19 de Outubro de 2019, participei na campanha de vacinação antirrábica nas sete freguesias do Município do Porto, no âmbito do Programa Nacional de Luta e Vigilância Epidemiológica da Raiva Animal e Outras Zoonoses (PNLVERAZ). Através da afixação de editais nas Juntas de Freguesia, os munícipes tomaram conhecimento da ação da campanha, o que lhes possibilitou beneficiar dos serviços respeitantes à vacinação antirrábica, identificação eletrónica e aquisição do boletim sanitário.

Na campanha de adoção de animais promovida pelo Município do Porto, que preconiza a ideia de uma *adoção responsável*, tive a oportunidade de intervir no aconselhamento dos munícipes por forma a tomarem uma decisão esclarecida e conscienciosa.

A atividade principal desenvolvida durante o estágio curricular teve como cerne o controlo oficial dos estabelecimentos abrangidos no Plano de Aprovação e Controlo de Estabelecimentos (PACE) e, nesse controlo, foi crucial a realização autónoma de uma componente laboratorial rigorosa, mas muito trabalhosa. Após a colheita de amostras seguiu-se o estudo microbiológico, mediante a identificação e quantificação dos microrganismos, cuja ação nos géneros alimentícios é determinante na segurança alimentar.

Com efeito, em termos de saúde pública, a segurança alimentar é de tal forma importante que a motivação primordial deste trabalho, através do controlo inspetivo dos estabelecimentos, residiu em contribuir não só para o benefício dos consumidores, como também para os próprios operadores, na medida em que foram sensibilizados para a melhor adequação da sua atividade à protecção da saúde pública.

I. Introdução

A segurança alimentar pode ser perspetivada, *stricto sensu*, como o oposto ao risco alimentar, ou seja, as práticas que evitem qualquer efeito negativo na saúde em consequência do consumo de géneros alimentícios. Numa ótica mais ampla, pode ser equacionada de forma a abranger as qualidades nutricionais dos géneros alimentícios bem como as preocupações sobre as propriedades dos alimentos.

A noção de qualidade alimentar compreende estas duas vertentes, mas extende-se por um território ainda mais vasto que inclui a apreciação subjetiva e psico-social dos consumidores. Todas as múltiplas vertentes que caracterizam a qualidade dos géneros alimentícios (e.g. segurança, valor nutricional, serviço, disponibilidade, qualidade sensorial) tendem a esbater-se à medida que os produtores consigam traduzir os desejos do consumidor em propriedades físicas evidentes nos seus produtos (Grunert, 2005).

O Regulamento (CE) n.º 178/2002 de 28 de Janeiro instituiu a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos como o objetivo de garantir um *elevado nível de proteção* da saúde humana e dos interesses dos consumidores em relação aos géneros alimentícios. Nesta perspetiva, uma eficaz atuação das autoridades fiscalizadoras pressupõe a concretização de procedimentos de controlo higio-sanitário que garantam a comercialização de géneros alimentícios seguros.

Médico Veterinário Municipal

O Médico Veterinário Municipal (MVM), enquanto autoridade sanitária veterinária concelhia, desenvolve a sua atuação, em colaboração com o Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural das Pescas, compete-lhe concretizar as ações nos domínios da saúde e bem-estar animal, da saúde publica veterinária, da segurança da cadeia alimentar de origem animal, da inspeção higio-sanitária, do controlo da higiene da produção, da transformação e da alimentação animal e dos controlos veterinários de animais e produtos. Os poderes de autoridade sanitária veterinária são conferidos aos MVM, por inerência de cargo, pela Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), enquanto autoridade sanitária veterinária nacional, e pela Direcção Geral da Fiscalização e Controlo da Qualidade Alimentar[1]. Estas responsabilidades não são delegáveis e abrangem as atividades exercida na respetiva área concelhia, quando esteja em causa a sanidade animal ou a saúde pública (*cf*. Decreto-Lei n.º 116/98 de 05 de Maio).

[1] *Atualmente integrada na Autoridade de Segurança Alimentar e Económica*

Plano de Aprovação e Controlo de Estabelecimentos - PACE

O PACE foi criado pela autoridade competente (DGAV) com o objetivo de defender a segurança alimentar e a saúde publica, bem como para assegurar o cumprimento das disposições comunitárias e internacionais de higiene relativas aos produtos de origem animal, através de um programa de vistorias aos estabelecimentos definido em função do risco estimado. Nas vistorias inspetivas é avaliado o cumprimento da legislação aplicável aos estabelecimentos que laboram produtos de origem animal, incluindo (i) os estabelecimentos industriais, comerciais e outros que necessitam de aprovação e (ii) os estabelecimentos retalhistas que laboram produtos de origem animal em natureza. Os registos e resultados dos controlos oficiais são inseridos numa plataforma eletrónica SIPACE (Sistema de Informação do Plano de Aprovação e Controlo dos Estabelecimentos) (DGAV, 2014).

No âmbito do PACE, o MVM deve realizar visitas periódicas de inspeção aos estabelecimentos de comércio a retalho de carnes nas respetivas áreas de intervenção. Incumbe-lhe realizar vistorias tendo em vista o grau de risco definido com ou sem aviso prévio, elaborar um auto de vistoria com sentido de decisão, notificar os operadores para o cumprimento dos prazos para correção das inconformidades e atualizar na base de dados eletrónica os resultados das ações (DGAV, 2014). Se a saúde publica estiver em causa, pode determinar a suspensão imediata da laboração do estabelecimento (*cf.* Decreto-Lei n.º 147/2006 de 31 de Julho).

Lista de verificação

No apoio aos controlos oficiais realizados pelo MVM utiliza-se uma *lista de verificação* elaborada pela autoridade competente. Nessa lista caracteriza-se o estabelecimento, considerando-se para esse efeito vários parâmetros nomeadamente, a atividade desenvolvida pelo estabelecimento (*e.g.* comércio a retalho de carne ou fabrico de preparados de carne), as espécies de carnes comercializadas, o número de trabalhadores e o fornecimento a outros operadores do setor alimentar. Seguidamente, procede-se à verificação das estruturas e equipamentos dos estabelecimentos inspecionados e respetiva higiene, inspecionam-se as carnes e os seus produtos relativamente à sua origem e estado de conservação, bem como da qualidade da água neles utilizada, com indicação do necessário suporte documental, em que se incluem as análises microbiológicas.

Nesta lista inspetiva verifica-se ainda a fiabilidade do autocontrolo e a avaliação dos procedimentos baseados nos princípios do HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*)

do estabelecimento, a rastreabilidade e rotulagem dos produtos, o uso de aditivos e o encaminhamento dos subprodutos/resíduos.

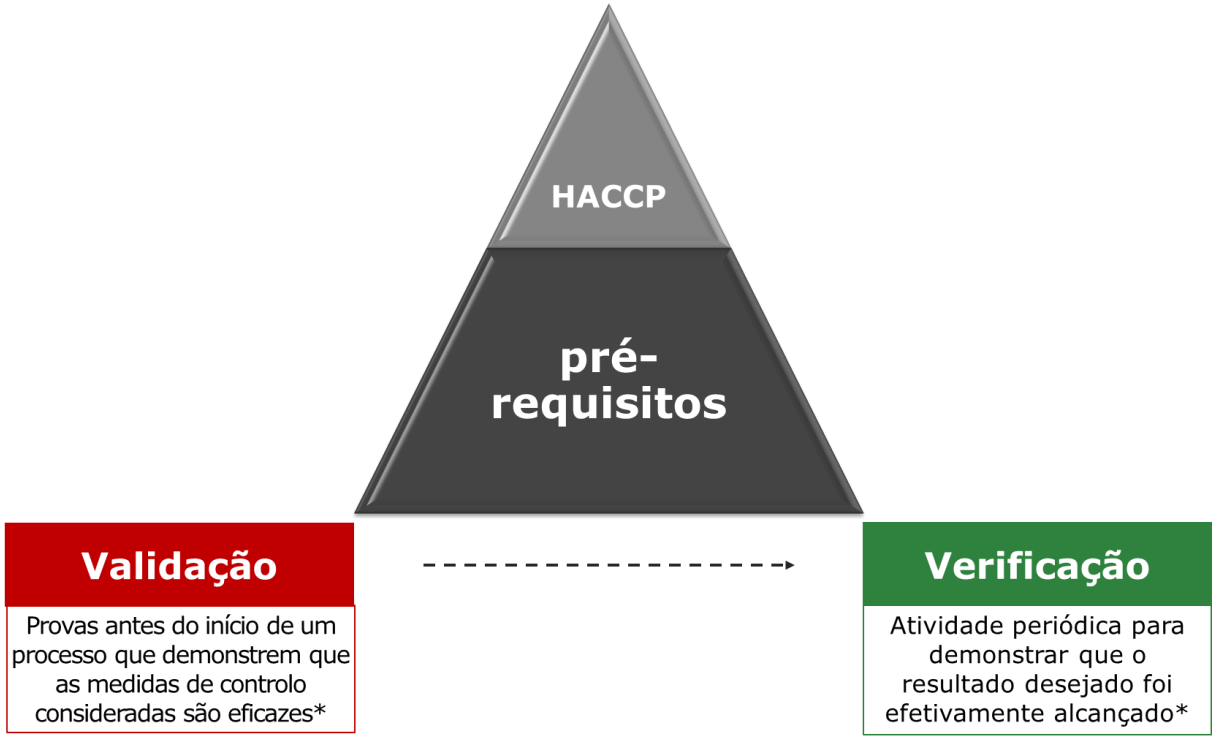


Figura 1. Ilustração esquemática do sistema de gestão de controlo da segurança alimentar. *Comunicação da Comissão (2016/C 278/01).

O procedimento do PACE inclui posteriormente a elaboração de um relatório sobre o controlo oficial realizado, em que se faz o registo eventual dos *Incumprimentos* constatados na visita inspetiva. Os operadores do estabelecimento devem ser notificados sobre as deficiências existentes no estabelecimento, ficando sujeitos a um prazo de cumprimento das *Desconformidades* num máximo de 60 dias.

O risco estimado para cada estabelecimento, é calculado em níveis crescentes compreendidos entre 1 e 4, tendo em conta o risco associado à atividade e o grau de incumprimento dos requisitos higio-sanitários. No entanto, no presente estágio curricular apenas foram visitados estabelecimentos com risco de atividade de grau 2-*manipulação de produtos*. O MVM classifica o grau de incumprimento relativo a cada uma das seguintes áreas: estruturas e equipamentos, higiene e limpeza, análises, qualidade da água, rastreabilidade e rotulagem, HACCP e subprodutos. A periodicidade das visitas inspetivas varia entre um mínimo de 6 meses a um máximo de 24 meses, de acordo com o risco estimado para cada estabelecimento (Quadro 1).

Quadro 1. Periocidade das visitas definida com base no grau de risco (DGAV, 2014).

Risco estimado	Próxima visita num prazo máximo de
Estabelecimentos com grau de risco 1	**24 meses**
Estabelecimentos com grau de risco 2	**18 meses**
Estabelecimentos com grau de risco 3	**12 meses**
Estabelecimentos com grau de risco 4	**6 meses**

Independentemente do risco estimado calculado, caso se verifique um grau de incumprimento de nível 4 ou 3 em alguma das mencionadas áreas, deve-se proceder à vistoria respetivamente decorrido o prazo de 1 e 3 meses, a contar da vistoria precedente (DGAV, 2014).

Microbiologia Alimentar

Os perigos microbiológicos veiculados pelos géneros alimentícios apresentam uma importante causa de doenças de origem alimentar para o ser humano (*cf.* Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de Novembro). Por esse motivo, as análises microbiológicas constituem uma parte do sistema da gestão do risco e do controlo dos perigos (INS Dr. Ricardo Jorge, 2019), podendo ser realizadas diversas determinações.

A quantificação de microrganismos aeróbios mesófilos totais, como a denominação bem evidencía, mede a carga microbiana total existente numa matriz alimentar, não permitindo distinguir se se tratam de espécies patogénicas, comensais ou com importância tecnológica. Este parâmetro é frequentemente utilizado como indicador da qualidade higiénica do alimento (Temelli, 2006).

Enterobacteriaceae , uma das famílias de bactérias Gram-negativo, integra um conjunto vasto de espécies bacterianas frequentes nas fezes de animais de sangue quente (incluindo os humanos), no solo e na água (Standards Unit Microbiology Services, 2013). Este grupo de microrganismos é pesquisado, precisamente, por serem bons indicadores da higiene relativamente à contaminação fecal. A deteção de *Enterobacteriaceae*, com ausência de Coliformes, nem sempre é correlacionável com contaminação por fezes. Assim, há autores que consideram a quantificação de coliformes um indicador mais preciso de higiene (Al-mutairi, 2011).

Escherichia coli (E. coli) é um coliforme pertencente à família *Enterobacteriaceae* com metabolismo anaeróbio facultativo que é comumente encontrado na microflora normal do intestino de animais de sangue quente. A maioria das estirpes são comensais inofensivas, porém, algumas

provocam diarreias mais ou menos graves, consoante a sua patogenicidade (Doyle & Buchanan, 2012).

O género *Staphylococcus* coloniza vulgarmente a pele as cavidades nasais dos seres humanos, sendo responsável por infeções oportunistas. Até à presente data foram identificadas sete espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivo, entre as quais se destaca *Staphylococcus aureus*; muitas das suas estirpes têm capacidade de produzir enterotoxinas termorresistentes, responsáveis por intoxicações alimentares (ASAE, n.d.).

Salmonella spp. pertence à família *Enterobacteriaceae* , sendo mais frequentes na carne de aves e nos ovos. As infeções causadas em humanos apresentam um quadro sintomatológico de febre, diarreia e náusea.

Listeria monocytogenes multiplica-se num amplo espectro de temperaturas: entre 0 e 45°C. Os alimentos prontos para consumo refrigerados proporcionam condições adequadas para o crescimento desta espécie bacteriana, sendo importantes veículos, particularmente para a população vulnerável, *i.e*., grávidas, neonatos e imuno-comprometidos. Os sintomas associados à listeriose são a septicémia, meningite e meningoencefalite (Doyle & Buchanan, 2012). Segundo Carpentier & Cerf (2011), este microrganismo é frequentemente encontrado em superfícies existentes na indústria alimentar, nomeadamente no pavimento, canalizações e equipamentos frigoríficos.

Em matéria de higiene de superfícies, na ausência de critérios microbiológicos estabelecidos internamente, utilizou-se, no presente trabalho, como linhas orientativas, os parâmetros de aceitabilidade definidos na revogada Decisão n.º 2001/471/CE. A este respeito, decidi não seguir os critérios microbiológicos propostos pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, 2019), atendendo a que os mesmos constituem parâmetros com um nível de exigência adequado para estabelecimentos de restauração.

II. Material e Métodos

Neste trabalho a seleção dos 20 talhos a controlar foi feita aleatoriamente, embora com a preocupação de abranger as sete freguesias existentes no Município do Porto.

O controlo oficial dos estabelecimentos iniciou-se no dia 4 de Novembro de 2019, mediante visitas inspetivas a dois talhos por semana, utilizando-se para o efeito uma *lista de verificação* criada pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária, no âmbito do Plano de Aprovação e Controlo de Estabelecimentos.

Para além da auditoria, procedeu-se igualmente à recolha de amostras de géneros alimentícios e de superfícies de contacto com os alimentos, incluindo as mãos. Em cada estabelecimento recolheram-se amostras na tábua de corte fino, escolhida pelo operador, o qual procedeu à respetiva higienização, tendo sido registado o procedimento utilizado. Seguidamente, numa área aproximada de 100 cm^2, com recurso a duas zaragatoas estéreis, previamente humedecidas em Água Peptonada Tamponada (APT) (Oxoid), percorreu-se exaustivamente a área amostrada, invertendo a direção entre passagens, após o que foram reintroduzidas num tubo *Falcon*® com 10 mL de APT. Colheram-se também amostras na faca de corte escolhida pelo operador e com uma largura suficiente de forma a possibilitar que a placa de contacto *RODAC*® (*Replicate Organism Detection and Counting*) pudesse ser totalmente preenchida. A colheita foi realizada após a usual higienização, que foi registada, pressionando levemente as placas de contacto durante aproximadamente 10 segundos contra a superfície da faca de corte. Por último, no que concerne ao controlo da higiene de superfícies, realizou-se um esfregaço às mãos do manipulador, com uma compressa estéril humedecida com 5 mL de APT, colocada posteriormente num saco *Stomacher*.

Recolheu-se, de forma assética para um saco *Stomacher*, 100 g de carne picada de bovino escolhida pelo operador. A temperatura da carne foi medida com um termómetro (*Checktemp* HI98501, HANNA) antes e depois de ser picada, exceto nos casos em que a carne picada já se encontrava no expositor (talhos #7 e #9) ou se encontrava embalada (talho #19). As amostras de carne foram transportadas numa caixa isotérmica, sem interrupção da cadeia de frio até ao laboratório de Microbiologia e Tecnologia Alimentar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Colocou-se um termómetro (*Temperature Logger* HI144, HANNA) na câmara de refrigeração de cada estabelecimento durante, aproximadamente, uma semana, período de tempo em que se efetuou o registo da temperatura em intervalo de 20 minutos.

1. Análise Microbiológica das superfícies

1.1. Preparação das diluições

Retirou-se 1 mL da suspensão inicial para um tubo de ensaio, contendo 9 mL de *Tryptone Salt broth* (TS) (Biokar Diagnostics), perfazendo a diluição de $10^{-2.}$ Este passo foi repetido até perfazer as diluições necessárias.

1.2. Quantificação de aeróbios mesófilos totais a 30°C (NP 4405:2002) (ISO 4833: 2003)

Com base nas diluições previamente preparadas, foram realizadas as sementeiras em meio PCA-*Plate Count Agar* (Biokar Diagnostics) pela técnica de incorporação de 1 mL de inóculo. As placas foram, de seguida, incubadas na estufa a 30°C, durante 72 horas. Todas as colónias presentes foram contabilizadas na diluição com um número compreendido entre 30 e 300. O resultado obtido foi expresso em UFC/cm^2.

1.3. Quantificação de *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2004).

A partir das diluições previamente preparadas, foram realizadas as sementeiras em meio VRBG-*Violet Red Bile Glucose agar* (Biokar Diagnostics) pela técnica de incorporação de 1 mL de inóculo. Seguidamente, as placas foram incubadas na estufa a 37°C, durante 24 horas. Procedeu-se à contagem de todas as colónias características presentes (cor rosa ou vermelho com ou sem precipitado em redor) em cada placa semeada e expressou-se o resultado obtido em UFC/cm^2.

As placas de contacto, com meio VRBG e PCA, foram incubadas na estufa a 37ºC durante 24 horas e a 30ºC durante 72 horas, respetivamente.

2. Análise Microbiológica das mãos dos operadores

Foram adicionados 15 mL de APT ao saco *Stomache*r que continha a compressa amostrada mantendo-se a mesma em revitalização durante uma hora.

2.1. Quantificação de *Staphylococcus aureus* (NP 4400-1: 2002)

Pela técnica de espalhamento, semearam-se 100 µl da suspensão em meio Chromagar Staph aureus (Chromagar Biokar Diagnostics), tendo a placa sido incubada na estufa a 37ºC durante 24 horas. Foram contabilizadas todas as colónias características (cor rosa/malva) presentes na placa semeada e o resultado obtido foi expresso em UFC/mão.

2.2. Quantificação de *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2004)

Semearam-se em meio VRBG, pela técnica de espalhamento, 100 µl da suspensão. Posteriormente, a placa foi incubada durante 24 horas a uma temperatura de 37°C. Todas as colónias características presentes na placa foram contabilizadas e o resultado foi expresso em UFC/mão.

Confirmou-se através de inoculação em TSI-*Triple sugar/iron agar* (Oxoid) as colónias típicas presentes no meio de cultura microbiológica VRBG.

3. Análise Microbiológica da carne

Com todos os cuidados de assépcia, procedeu-se à pesagem de 25 g de carne picada para um saco esterilizado *Stomacher*, no qual se adicionaram 225 mL de APT e duas gotas de *Tween 80* (Merck). De seguida, homogenizou-se em *Stomacher* (Seward) durante 30 segundos. A preparação das diluições seriadas foi realizada como referido anteriormente.

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*, pesaram-se mais 25 g de amostra que foram enriquecidas em 225 mL de *Fraser I* (meio de enriquecimento seletivo primário) mediante incubação desta suspensão na estufa a 30ºC, durante 24 horas.

3.1. Quantificação de aeróbios mesófilos totais a 30°C (ISO 4833: 2003)

Conforme o procedimento referido no ponto 1.2.

3.2. Quantificação de *Escherichia coli* (ISO 16649-2: 2001)

A partir de diferentes diluições decimais inoculou-se através da técnica de incorporação 1 mL em meio TBX-*Tryptone Bile X-Glucuronidemedium* (Biokar Diagnostics) e incubou-se em estufa a 37ºC, durante 24 horas. Contabilizaram-se todas as colónias características, *i.e.*, com uma cor azul presentes nas placas semeadas e o resultado foi expresso em UFC/g de amostra.

3.3. Quantificação de *Staphylococcus* coagulase-positivo (NP 4400-1: 2002)

A partir das diluições decimais previamente preparadas, semearam-se 100 µl de inóculo por espalhamento em meio BP-ovo (*Baird Parker* Agar + gema de ovo) e, posteriormente, procedeu-se à incubação a 37ºC, durante 48 horas. Todas as colónias características (cor cinzenta/preta brilhante com halo transparente) presentes foram contabilizadas e o resultado foi expresso em UFC/g de amostra.

3.4. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2: 1998)

Retirou-se 1 mL da enriquecimento inicial em *Fraser I* para um tubo de ensaio com 9 mL de *Fraser II* (meio de enriquecimento seletivo secundário; Biokar Diagnostics). De seguida, durante 24 horas, o tubo de ensaio foi incubado na estufa a 37ºC. Decorrido esse tempo, inocularam-se por espalhamento 100 µl da suspensão em *Fraser II* em meio seletivo *Palcam* (Oxoid). Através de um teste *RAPID®CB PLUS System* (Remel) foi possível identificar a espécie.

3.5. Pesquisa de *Salmonella* spp. (ISO 6579: 2002)

Após o enriquecimento em APT durante 16-18 horas a 30ºC, procedeu-se à transferência de 25 µl para o centro de uma placa de MSRV-*Semisolid Modified Rappaport-Vassiliadis* (Biokar Diagnostics) incubando-se a mesma a 41,5ºC, durante 24 horas. Nos enriquecimentos suspeitos (halo de crescimento concêntrico originado a partir do ponto de inoculação) semeou-se por esgotamento em meio HEA-*Hectoen Enteric Agar* (Biokar Diagnostics) e incubou-se a 37ºC, durante 24 horas. A confirmação foi realizada através de diversos testes bioquímicos, como o TSI.

4. Pesquisa de inibidores

Em duas placas com MH-*Mueller-Hinton* (Biokar Diagnostics) previamente inoculadas com recurso a zaragatoa duas bactérias muito sensíveis a inibidores: *Bacilus subtilis* ATCC 6633 e *Micrococcus luteus* ATCC 9344. Colocaram-se, posteriormente, três *discos brancos* (Oxoid) em cada placa, tendo os mesmos sido carregados com 10 µl de suco de carne. Acrescentou-se em cada placa um disco de Ampicilina como controlo positivo e um disco em branco com 10 µl de água destilada como o controlo negativo. Posteriormente, as placas foram incubadas na estufa, a 37ºC, durante 24 horas.

5. Medição do pH

Durante todo o estudo, procedeu-se à medição e registo do pH das amostras de carne picada, com auxílio de um potenciómetro (HANNA halo fc2022).

6. Avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos

A partir das sementeiras de *E. coli* e *S. aureus*, repicou-se uma ou mais colónias em função da diversidade fenotípica detetada através do exame visual e da existência de colónias bem isoladas. A sensibilidade destas estirpes aos antimicrobianos foi testada pelo método de *Kirby-Bauer* (método de difusão em disco), seguindo as *guidelines* M02-A11 e M100-S27, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (M02-A11, CLSI; M100-S27, CLSI). Para assegurar a pureza dos isolados de *E. coli*, antes de serem testados, repicaram-se para 5 mL de CBVB-Caldo Bilis Verde Brilhante (Biokar Diagnostics) e incubaram-se a 44,5ºC, durante 24 horas. No dia seguinte, foram inoculados em HEA por esgotamento, a partir das suspensões em CBVB que se encontravam turvas. Para a realização dos testes de sensibilidade, as colónias foram repicadas para APT e incubadas a 37ºC até ser atingida uma turvação de aproximadamente 0,5 *McFarland*. A partir dessa suspensão, realizou-se uma sementeira, com recurso a zaragatoa em meio MH. As placas, contendo os discos de antibiótico (Oxoid), foram incubadas a 37ºC, durante 24 horas. Decorrido esse tempo de incubação, procedeu-se à medição do diâmetro dos halos de inibição e à interpretação dos mesmos, recorrendo aos critérios para *Enterobacteriaceae* , *Staphylococcus* spp. (M100-S27, CLSI). Foram testados os seguintes antimicrobianos: Ceftazidima (CAZ, 30 µg), Tobramicina (TOB, 10µg), Cloranfenicol (CHL, 30µg), Levofloxacina (LVX, 5µg), Estreptomicina (STR, 10 µg), Amicacina (AMK, 30µg), Cefotaxima (CTX, 30µg), Amoxicilina/ Ácido Clavulânico (AMC, 30µg), *Aztreonam* (ATM, 30µg), Cefoxitina (FOX, 30µg), Ampicilina (AMP, 10µg), Cefazolina (CFZ, 30µg), Tetraciclina (TET, 30µg), Nitrofurantoína (NIT, 300µg) Gentamicina (GEN, 10µg, 120µg), Ciprofloxacina (CIP, 5µg), *Imipenem* (IPM, 10µg), Doxiciclina (DOX, 30µg), Sulfametoxazol + Trimetoprim (SXT, 25µg), Azitromicina (AZM, 15µg), Rifampicina (RIF, 5µg), Quinupristina Dalfopristina (QD, 15µg), Penicilina G (PEN, 10U), Ceftarolina (CPT, 30µg), Teicoplanina (TEC, 30µg), Linezolida (LZD, 30µg), Clindamicina (CLI, 2µg), Oxacilina (OXA, 1µg) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

III. Resultados e Discussão

Caracterização dos estabelecimentos

Com base na lista de verificação e perguntas adicionais formuladas no controlo oficial, caracterizou-se cada estabelecimento com dados relevantes para o estudo em causa (Quadro 2).

Na segunda coluna, as letras correspondem a diferentes fornecedores. Indica-se o preço por quilo de carne picada, o volume de vendas semanal de carne de bovino, a idade média do responsável do estabelecimento e se este fornece carnes a outros operadores do setor alimentar, como por exemplo restauração, cantinas ou outros talhos.

Quadro 2. Caracterização geral dos estabelecimentos; legenda: N/D não definido.

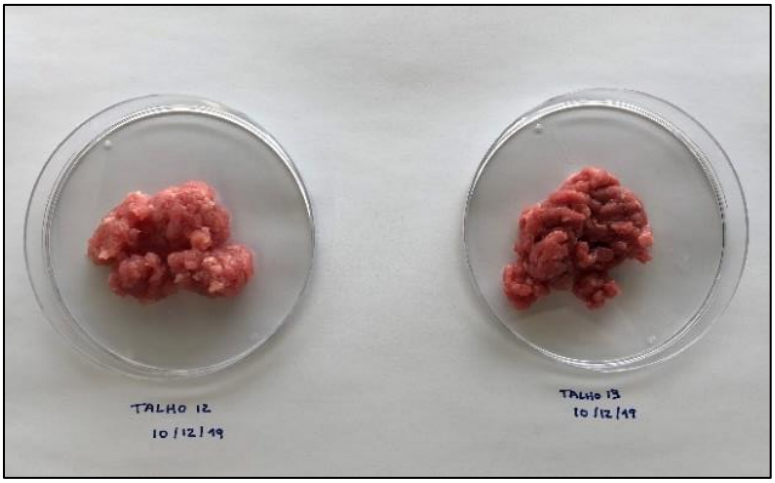
Talho	Fornecedor	Preço (€/kg)	Fornece outros operadores	Idade (anos)	Vendas de carne de bovino (kg/semana)
1	A	8,50	Sim	40-60	300-400
2	A	5,99	Não	> 60	200-300
3	A	5,99	Sim	> 60	700-800
4	N/D	9,99	Não	40-60	N/D
5	A	5,99	Não	40-60	200-300
6	B	8,60	Sim	40-60	100-200
7	A	5,00	Sim	40-60	400-500
8	C	5,99	Sim	20-40	700-800
9	D	4,99	Sim	40-60	400-500
10	E	7,40	Sim	> 60	300-400
11	F	6,25	Sim	40-60	400-800
12	A	6,99	Não	> 60	<200
13	G	6,60	Sim	40-60	>800
14	A	9,00	Sim	> 60	<200
15	A	7,95	Sim	40-60	300-400
16	H	6,49	Sim	40-60	400-500
17	I	8,99	Sim	40-60	200-300
18	A	7,90	Sim	40-60	200-300
19	J	3,16	Sim	20-40	>800
20	A	8,90	Não	> 60	100-200

Pese embora os operadores contratarem diferentes fornecedores de carne, a preferência da maioria dos talhos pelo mesmo fornecedor deveria ter como consequência uma maior uniformidade no preço da carne picada. No entanto, em virtude de alguns talhos terem optado por picar carne a partir de *peças de primeira* justifica a disparidade nos preços de venda.

Considerou-se relevante a indicação da idade média do responsável do estabelecimento, na medida em que esse fator é suscetível de estar correlacionado com a instrução e a predisposição

para a aquisição e aplicação de novas práticas. Adicionalmente, verificámos que muitos operadores já não perspetivam o comércio de carnes a retalho como uma atividade promissora, em consequência da preferência dos consumidores pelas grandes superfícies.

A informação sobre o volume de vendas semanal de cada talho foi incluída em virtude de ser um dos parâmetros considerados na avaliação do risco e na definição da periodicidade das auditorias no âmbito do PACE. Curiosamente, os dois estabelecimentos (talhos #13 e #19) com maior volume de vendas semanal (>800 kg/semana) encontram-se no restrito grupo de quatro talhos que obtiveram resultados maioritariamente *Satisfatórios* no controlo microbiológico das três superfícies de contacto alimentar amostradas em cada estabelecimento neste estudo, e que foram a tábua de corte, a faca e as mãos de um manipulador (Quadro 3). O talho #19 foi mesmo o único a obter resultados *Satisfatórios* em todas as superfícies. Por sua vez, entre os estabelecimentos com menor volume de vendas (<200 kg de carne picada/semana), o talho #12 também integrava o grupo dos quatro talhos com melhor performance na higienização, com o destaque positivo de ter sido o único desse grupo em que as mãos do manipulador não estavam colonizadas com *S. aureus*. No respeitante aos níveis de contaminação por *E. coli* na carne picada (Quadro 4), parece não existir qualquer correspondência entre o volume de produção e este parâmetro.



Fotografia 1. Amostras de carne picada de bovino do talho #12 e #13 (arquivo pessoal).

Plano de higienização

Um dos pré-requisitos do sistema de gestão da segurança alimentar é constituído pelos *procedimentos de higienização* para cada estabelecimento. O Quadro 3 abrange o plano de higienização praticado pelos talhos, bem como o controlo microbiológico das superfícies em contacto com os géneros alimentícios (tábua de corte fino, faca de corte e mãos do manipulador) realizado durante o estágio. Relativamente à primeira componente, verificou-se uma grande heterogeneidade nas práticas de higienização, com alguns estabelecimentos a praticarem procedimentos tecnicamente adequados e outros, ao invés, desaconselhados, como por exemplo o uso de produtos multiusos e lixívia. Dos estabelecimentos que foram objeto de controlo inspetivo, treze deles seguiam um protocolo de higienização das superfícies, havendo nove que verificavam a eficácia das práticas de higienização. A este respeito salienta-se que nenhum dos referidos estabelecimentos utilizava biocidas aprovados pela DGAV e que são de uso obrigatório em todos os estabelecimentos que processem carnes (*cf.* artigo 20.º do Decreto-Lei n.º 147/2006 de 31 de Julho).

A carga microbiana total na tábua de corte fino da maioria dos estabelecimentos ultrapassou o limite de referência de 10 UFC/cm^2 previsto na Decisão n.º. 2001/471/CE. Segundo Íris *et al*. (2010) não obstante este grupo de microrganismos não oferecer um risco direto para a saúde, é considerado um indicador do processo de higiene. Em rigor, apenas o talho #19 (que higienizava com o recurso combinados à raspagem, lavagem com detergente e desinfeção) obteve um resultado satisfatório, com um valor de 2 UFC/cm^2. Importa ressalvar que nos talhos #1 e #2 a amostra da superfície da tábua e da faca de corte foram recolhidas antes da higienização. O talho #4 registou o valor mais elevado, com uma contagem de 2,8x10^6 UFC/cm^2. Neste estabelecimento a limpeza realizava-se com recurso a esfregão e lixívia. Dois talhos apresentaram valores entre 10 e 1000 UFC/cm^2 e sete estabelecimentos valores entre 1000 e 10 000 UFC/cm^2.

Na tábua de corte fino procedeu-se à contagem de *Enterobacteriacea* e concluiu-se que mais de metade dos resultados estão acima do limite de 1 UFC/cm^2 fixado na mencionada Decisão Comunitária. Segundo Stiles & Ng (1981), a manipulação de carne fresca está diretamente relacionada com uma contagem elevada de *Enterobacteriacea.* O talho #4 voltou a registar o valor mais elevado, acima de 1,0x10^3 UFC/cm^2. Oito estabelecimentos registaram valores de contaminação superiores a 10 UFC/cm^2 e quatro talhos registaram um valor abaixo do limite de deteção (menor que 1,0x10^{-1} UFC/cm^2).

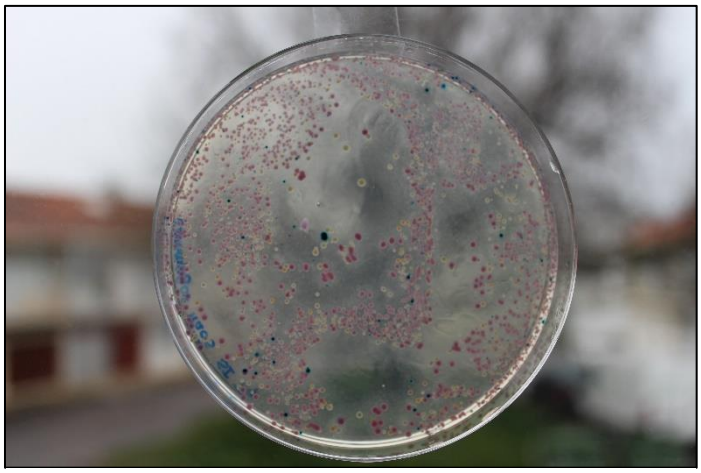
Quadro 3. Plano de higienização e controlo microbiológico de superfícies; Legenda: Aeróbios Mesófilos Totais (AMT); Detergente (det.); Não definido (N/D).

Talho	Tábua de corte fino			Faca de corte			Esfregaço de mãos			Protocolo de higienização das superfícies	Biocidas de uso Veterinário	Verificação do método de higienização
	Higienização	AMT (UFC/cm²)	Enterobacteriaceae (UFC/cm²)	Higienização	AMT (UFC/cm²)	Enterobacteriaceae (UFC/cm²)	Higienização	Enterobacteriaceae (UFC/mãos)	*S. aureus* (UFC/mãos)			
1	N/D	$8,4x10^{5}$	$4,9x10^{2}$	N/D	$> 1,0x10^{2}$	$1,7x10^{1}$	Sabonete Líquido	$7,5x10^{4}$	N/D	N/D	N/D	N/D
2	N/D	$5,3x10^{4}$	$2,5x10^{1}$	N/D	$> 1,0x10^{2}$	$< 4,0x10^{-2}$	Detergente Comercial	$8,0x10^{2}$	N/D	N/D	N/D	N/D
3	Esfregão com det. e desengordurante	$3,4x10^{3}$	$4,3x10^{1}$	Água quente, det. e desengordurante	$> 1,0x10^{2}$	$2,2x10^{0}$	Sabonete Líquido	$6,0x10^{2}$	$1,2x10^{3}$	Sim	Não	Não
4	Esfregão e lixívia	$2,8x10^{6}$	$> 1,0x10^{3}$	Lixivia	$> 1,0x10^{2}$	$> 1,0x10^{2}$	N/D	$8,1x10^{4}$	$4,0x10^{2}$	Não	Não	Não
5	Raspagem	$7,7x10^{4}$	$5,3x10^{0}$	Produto multiusos	$3,2x10^{-1}$	$< 4,0x10^{-2}$	Sabonete Líquido	$< 2,0x10^{2}$	$< 2,0x10^{2}$	Sim	Não	Sim
6	Esfregão e desinfetante bactericida	$2,6x10^{3}$	$3,0x10^{-1}$	Esfregão e desinfetante bactericida	$> 1,0x10^{2}$	$1,2x10^{-1}$	Álcool Gel	$< 2,0x10^{2}$	$1,2x10^{4}$	Sim	Não	Não
7	Raspagem	$9,3x10^{4}$	$2,6x10^{2}$	Esfregão com det. e desengordurante	$5,3x10^{0}$	$< 4,0x10^{-2}$	Sabonete Líquido	$2,0x10^{2}$	$5,0x10^{3}$	Não	Não	Não
8	Máquina de pressão e det.	$2,5x10^{3}$	$5,1x10^{1}$	Detergente	$> 1,0x10^{2}$	$2,0x10^{-1}$	Detergente	$2,0x10^{2}$	$2,0x10^{3}$	Sim	Não	Não
9	Raspagem	$8,0x10^{5}$	$7,3x10^{2}$	Produto multiusos	$> 1,0x10^{2}$	$4,4x10^{-1}$	N/D	$1,0x10^{3}$	$1,3x10^{5}$	Não	Não	Não
10	Raspagem	$3,1x10^{2}$	$< 1,0x10^{-1}$	Detergente comercial	$5,5x10^{0}$	$< 4,0x10^{-2}$	Sabonete Líquido	$< 2,0x10^{2}$	$4,0x10^{2}$	Sim	Não	Sim
11	Máquina de pressão e limpador desengordurante	$1,5x10^{4}$	$1,8x10^{1}$	Esfregão e detergente	$4,2x10^{0}$	$8,0x10^{-2}$	Sabonete Líquido	$3,6x10^{3}$	$4,9x10^{3}$	Sim	Não	Sim
12	Raspagem e det. desengordurante	$7,7x10^{3}$	$< 1,0x10^{-1}$	Esfregão com det. desengordurante bactericida	$< 4,0x10^{-2}$	$< 4,0x10^{-2}$	Sabonete Líquido	$< 2,0x10^{2}$	$< 2,0x10^{2}$	Sim	Não	Não
13	Máquina de pressão	$7,2x10^{3}$	$< 1,0x10^{-1}$	Água quente	$4,2x10^{0}$	$< 4,0x10^{-2}$	Sabonete Líquido	$< 2,0x10^{2}$	$2,8x10^{3}$	Sim	Não	Sim
14	Esfregão, amoníaco e det. comercial	$1,8x10^{5}$	$2,6x10^{0}$	Detergente comercial	$9,3x10^{0}$	$1,4x10^{0}$	Sabonete Líquido	$4,0x10^{1}$	$< 2,0x10^{2}$	Sim	Não	Sim
15	Escova com det. e desengordurante	$6,9x10^{4}$	$4,7x10^{0}$	Detergente e desengordurante	$6,9x10^{0}$	$4,0x10^{-2}$	Sabonete Líquido	$1,4x10^{3}$	$< 2,0x10^{2}$	Sim	Não	Sim
16	Máquina de pressão e det.	$1,9x10^{3}$	$2,0x10^{-1}$	Detergente concentrado	$> 1,0x10^{2}$	$4,7x10^{0}$	Sabonete Líquido	$6,6x10^{4}$	$< 2,0x10^{2}$	Sim	Não	Sim
17	Máquina de pressão	$6,6x10^{3}$	$1,0x10^{0}$	Det. germicida e bactericida	$5,1x10^{0}$	$2,8x10^{-1}$	Sabonete Líquido	$< 2,0x10^{2}$	$< 2,0x10^{2}$	Não	Não	Não
18	Escova, lixívia e máquina de pressão	$2,5x10^{2}$	$9,1x10^{0}$	Esfregão e lixívia	$1,1x10^{0}$	$< 4,0x10^{-2}$	Sabonete Líquido	$< 2,0x10^{2}$	$< 2,0x10^{2}$	Sim	Não	Sim
19	Raspagem e det. Desinfetante	$2,0x10^{0}$	$< 1,0x10^{-1}$	Detergente desinfetante	$1,2x10^{-1}$	$< 4,0x10^{-2}$	Sabonete líquido	$< 2,0x10^{2}$	$< 2,0x10^{2}$	Sim	Não	Sim
20	Esfregão e lixívia	$1,9x10^{4}$	$1,3x10^{0}$	Esfregão e água	$> 1,0x10^{2}$	$< 4,0x10^{-2}$	Sabonete Líquido	$< 2,0x10^{2}$	$1,0x10^{5}$	Não	Não	Não

Relativamente à faca de corte, aproximadamente metade dos estabelecimentos apresentaram uma carga microbiana total *Não Satisfatória*, com valores superiores a $1{,}0x10^2$ UCF/cm^2. Por sua vez, na contagem de *Enterobacteriaceae* obtiveram-se 16 resultados satisfatórios, havendo três talhos com valores inferiores a 10 mas superiores a 1 UFC/cm^2 e apenas um em que o valor registado era superior a $1{,}0x10^2$ UFC/cm^2. Em nove estabelecimentos registou-se um valor inferior ao limite de deteção do ensaio.

Em termos gerais, será recomendável que os operadores recorram a produtos de limpeza homologados para uso em superfícies de contacto alimentar, que elevem a frequência dos procedimentos de higienização, particularmente das tábuas de corte e das mãos dos manipuladores, e que o façam com recurso a protocolos técnicos adequados às necessidades de cada estabelecimento.

No controlo microbiológico das mãos dos manipuladores, que para os efeitos deste trabalho foram também consideradas superfícies em contacto com géneros alimentícios, 56% das amostras recolhidas, revelaram contagens elevadas de *S. aureus*, ultrapassando o limite de 10^2 UFC/mão definido por Litz e colaboradores (2007). No talho #9 o valor apurado foi de $1{,}3x10^5$ UFC/mãos.



Fotografia 2. Quantificação de *S. aureus* em meio *Chromagar*.

Nos talhos #1 e #2, por motivos logísticos não se quantificou laboratorialmente *S. aureus*. Segundo Lues & Tonder (2007), *S. aureus* é, dentro do género *Staphylococcus*, a espécie mais frequentemente associada a toxinfeções alimentares causadas e a que mais recorrentemente se deteta nas mãos de manipuladores de alimentos cozinhados. Por seu turno, Queico & Leite (1988) defendem que a presença deste microrganismo nas mãos advém do contacto com as respetivas fossas nasais. Assim, a elevada contagem de *S.aureus* nas mãos dos manipuladores, encontrada neste estudo, poderá ser melhorada com uma correta higienização das mãos e melhores práticas de higiene individual.

Também 55% das mãos dos operadores apresentavam contaminação por *Enterobacteriaceae*, tendo o valor mais elevado alcançado uma contagem de $8{,}1x10^4$ UFC/mãos, embora não se tenha detetado qualquer correspondência entre estes dois parâmetros. Globalmente, o talho #1 foi o que apresentou os resultados mais críticos. Por sua vez, os talhos #5, #6, #10, #12, #13, #17, #18, #19

e #20 apresentaram resultados inferiores ao limite de detecção da técnica de quantificação de *Enterobacteriaceae*. Curiosamente, sete destes nove talhos tinham protocolos para a higienização das superfícies e verificavam regularmente a eficácia dos seus procedimentos. Na Comunicação da Comissão sobre a implementação de sistemas de gestão de segurança alimentar (2016/C 278/01) refere-se *que o objetivo da flexibilidade é procurar garantir a proporcionalidade das medidas de controlo adaptando-as à natureza e à dimensão do estabelecimento*. Por esse motivo, não é exigível um plano de higienização geral atendendo às diferentes características dos estabelecimentos. Neste sentido, a referida Comunicação da Comissão esclarece que a *limpeza e a desinfeção num pequeno talho podem ser muito semelhantes às boas práticas de higiene de uma cozinha*.

Higiene e Segurança da carne picada

O operador é responsável por garantir a segurança dos géneros alimentícios devendo cumprir, para esse efeito, os critérios microbiológicos estabelecidos no referido Regulamento n.º 2073/2005.

Nos resultados apresentados no Quadro 4 descrevem-se os controlos físico e microbiológico aplicados à carne picada. As amostras recolhidas nos talhos #9 e #19 foram consideradas preparado de carne, em virtude de conterem aditivo. A adaptação ao protocolo, numa fase inicial, implicou que não se tenha procedido à quantificação de *Staphylococcus* coagulase-positivo nos talhos #1 e #2. Os dados da última coluna permitem aferir se cada estabelecimento contratou uma empresa de assessoria de HACCP.

No presente estudo, a não deteção de *Salmonella* spp., em todas as amostras de carne picada analisadas, comprovou o cumprimento do critério de segurança exigido para o género alimentício. Outro indicador de segurança do alimento traduziu-se na ausência de *Listeria monocytogenes*. No entanto, este indicador só é exigido, pelo legislador comunitário, em alimentos *prontos para consumo*. Por último, salienta-se a positividade das amostras por não terem sido detetados inibidores como antibióticos.

Na determinação da carga microbiana total, 70% das amostras de carne picada foram consideradas *Não Satisfatórias* na medida em que ultrapassaram o limite estabelecido no Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro, que se fixa em $5x10^6$ UFC/g[2].

[2] *Este critério não é aplicável à carne picada produzida a nível do comércio a retalho quando o período de vida útil do produto for inferior a 24horas.*

A contagem mais elevada obtida foi de $5{,}0x10^9$ UFC/g e a mais baixa de $1{,}0x10^4$ UFC/g, sendo cinco amostras consideradas *Aceitáveis*, com valores compreendidos entre $5x10^5$ e $5x10^6$ UFC/g.

Quadro 4. Controlo físico e microbiológico das amostras de carne picada; abreviaturas: AMT (Aeróbios Mesófilos Totais) (); (Staph.) Staphylococcus; N/D (Não Determinado).

Talho	Carne Picada										
	Indicadores de Higiene (UFC/g)			Indicadores de Segurança			Controlo Físico				Assessoria de HACCP
							Temperatura °C			pH	
	ATM	*E. coli*	*Staph.* coagulase-positivo	*Salmonella* spp.	*Listeria monocytogenes*	Presença de inibidores	Antes	Depois	Variação		
1	$5{,}7x10^8$	$1{,}0x10^4$	N/D	Ausente	Ausente	Negativo	N/D	N/D	N/D	N/D	Não
2	$3{,}7x10^7$	$< 1{,}0x10^1$	N/D	Ausente	Ausente	Negativo	N/D	N/D	N/D	N/D	Não
3	$9{,}5x10^7$	$5{,}5x10^3$	$1{,}0x10^4$	Ausente	Ausente	Negativo	0,7	1,3	0,6	N/D	Sim
4	$1{,}6x10^8$	$4{,}0x10^2$	$5{,}6x10^5$	Ausente	Ausente	Negativo	1,7	3,2	1,5	5,5	N/D
5	$4{,}6x10^6$	$5{,}0x10^2$	$5{,}0x10^4$	Ausente	Ausente	Negativo	3,0	4,2	1,2	5,6	Sim
6	$1{,}8x10^7$	$< 1{,}0x10^1$	$5{,}0x10^4$	Ausente	Ausente	Negativo	4,3	8,6	4,3	5,6	Sim
7	$3{,}6x10^7$	$7{,}4x10^4$	$3{,}6x10^5$	Ausente	Ausente	Negativo	N/D	2,0	2,0	5,8	Sim
8	$3{,}6x10^6$	$1{,}0x10^2$	$1{,}1x10^5$	Ausente	Ausente	Negativo	2,2	7,7	5,5	5,6	Sim
9	$5{,}0x10^9$	$2{,}7x10^4$	$3{,}1x10^5$	Ausente	Ausente	Negativo	N/D	3,7	3,7	6,2	Sim
10	$6{,}4x10^7$	$< 1{,}0x10^1$	$3{,}0x10^4$	Ausente	Ausente	Negativo	5,0	9,6	4,6	5,6	Sim
11	$6{,}8x10^6$	$2{,}1x10^4$	$9{,}7x10^4$	Ausente	Ausente	Negativo	5,6	9,6	4,0	5,8	Sim
12	$6{,}6x10^6$	$< 1{,}0x10^1$	$3{,}1x10^5$	Ausente	Ausente	Negativo	2,5	10,3	7,8	5,6	Não
13	$5{,}4x10^6$	$1{,}0x10^1$	$8{,}0x10^3$	Ausente	Ausente	Negativo	2,8	10,8	8,0	5,7	Sim
14	$5{,}6x10^7$	$1{,}8x10^3$	$6{,}4x10^5$	Ausente	Ausente	Negativo	2,3	9,1	6,8	5,7	Sim
15	$2{,}5x10^6$	$< 1{,}0x10^1$	$2{,}6x10^4$	Ausente	Ausente	Negativo	4,4	10,3	5,9	5,6	Sim
16	$1{,}0x10^4$	$< 1{,}0x10^1$	$8{,}0x10^3$	Ausente	Ausente	Negativo	3,9	10,0	6,1	5,7	Sim
17	$2{,}0x10^6$	$< 1{,}0x10^1$	$3{,}7x10^4$	Ausente	Ausente	Negativo	4,0	12,8	8,8	5,7	Sim
18	$7{,}9x10^5$	$2{,}3x10^3$	$9{,}0x10^3$	Ausente	Ausente	Negativo	5,1	9,5	4,4	5,6	Sim
19	$2{,}7x10^8$	$3{,}3x10^4$	$1{,}0x10^3$	Ausente	Ausente	Negativo	N/D	N/D	N/D	5,9	Sim
20	$4{,}3x10^8$	$3{,}9x10^3$	$9{,}2x10^4$	Ausente	Ausente	Negativo	5	7,7	2,7	5,7	Não

Na quantificação de *E. coli*, 45 % das amostras foram avaliadas como *Não Satisfatórias* por acusarem valores acima do limite máximo legalmente estabelecido (> 500 UFC/g) para a carne picada e para os preparados de carne (>5000 UFC/g), evidenciando manifestas insuficiências nas boas práticas de higiene (Tamagnini *et al* 2003). Concretamente, o valor mais elevado atingiu $7{,}4x10^4$ UFC/g na amostra recolhida no talho #7. Este não tinha protocolo para a higienização das superfícies e também não verificava a eficácia dos seus procedimentos, revelou resultados *Não Satisfatórios* (AMT e *Enterobacteriaceae*) na apreciação da higiene da tábua de corte e as mãos do operador revelaram contaminação abundante por *S. aureus* e *Enterobacteriaceae*. Por sua vez, o estabelecimento em que se registaram os resultados mais insatisfatórios relativamente à

higienização das superfícies (talho #9) apresentou também uma elevada contaminação por *E. coli* na carne picada ($2,7x10^4$ UFC/g) e a maior carga microbiana total ($5,0x10^9$ UFC/g).

No conjunto dos resultados relativos à quantificação de *E. coli*, oito amostras tiveram apreciação *Satisfatória* por se encontrarem abaixo do limite de deteção da técnica ($<1,0x10^1$ UFC/g), uma revelou um valor inferior a 50 UFC/g (*Satisfatória*) e três amostras foram consideradas *Aceitáveis* por apresentarem valores entre 50 e 500 UFC/g.

Segundo Santos e colaboradores (2017), o limite considerado satisfatório para a contagem de *Staphylococcus* coagulase-positivo deve ser inferior a $5,0x10^3$ UFC/g de amostra. Nas vinte amostras de carne picada avaliadas, apenas a amostra do talho #19 se revelou satisfatória à luz deste critério. Este mesmo talho revelou também resultados satisfatórios no controlo da higiene de superfícies, embora se tenha detetado *S. aureus* nas mãos do manipulador. Em seis talhos registaram-se valores de *Staphylococcus* coagulase-positivo superiores a 100000 UFC/g. Com a excepção dos talhos #12 e #14, nos restantes quatro o controlo das superfícies revelou resultados *Não Satisfatórios* e a presença de *S. aureus* nas mãos dos manipuladores. Estes resultados confirmam as observações de Normanno e colaboradores (2005), que associam contagens elevadas de *Staphylococcus* coagulase-positivo à contaminação do meio ambiente e à manipulação da carne pelos operadores.



Fotografia 3. Pesquisa de inibidores através de uma prova biológica na amostra de carne picada recolhida no talho #18 (arquivo pessoal).

Antibiorresistencias

A eficácia na utilização de agentes terapêuticos fica comprometida com o desenvolvimento de tolerâncias e resistências por microrganismos, desde a primeira vez que é utilizado (Davies & Davies, 2010).

As colónias de *E. coli* provenientes das amostras de carne picada foram repicadas para o meio *Hektoen* com a finalidade de se testar a sensibilidade a diferentes antibióticos. O Quadro 5 apresenta os resultados obtidos, assinalando-se as percentagens de resistência de cada isolado. Neste conjunto de isolados as resistências mais frequentes foram à Ampicilina (75%), Tetraciclina (58%) e Trimetoprima-sulfametoxazole (50%). Opostamente, não se detetaram resistências às cefalosporinas de 3ª geração e ao Imipenema. O isolado com maior número de resistências aos antimicrobianos testados foi isolado no talho #7 (isolado T7Amst2), coincidentemente um dos talhos com maiores níveis de contaminação por *E. coli* e *S. aureus*.

Quadro 5. Susceptibilidade aos antimicrobianos em *E. coli* isolados obtidos a partir das amostras de carne picada; Legenda: S- sensível; I-intermédio; R-resistente.

	Data	19/11/2019	22/11/2019	22/11/2019	02/12/2019	02/12/2019	09/12/2019	16/12/2019	21/12/2019	21/01/2020	21/01/2020	27/01/2020	30/01/2020
	Identificação	**T05A mst**	**T7A mst1**	**T7A mst2**	**T08A mst**	**T09A mst**	**T11A mst**	**T13A mst**	**T14A mst**	**T18A mst**	**T19A mst**	**T21A mst**	**T20A mst**
	Talho	5	7	7	8	9	11	13	14	18	19	21	20
Antibióticos	**Ampicilina**	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
	Amoxicilina/Ácido Clavulânico	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Cefoxitina	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
	Ceftazidima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Cefotaxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Aztreonam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Gentamicina	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
	Tobramicina	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Estreptomicina	R	I	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S
	Tetraciclina	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S
	Doxiciclina	I	S	I	I	I	I	S	S	S	S	S	S
	Ciprofloxacina	I	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S
	Sulfametoxazol + Trimetoprim	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S
	Cloranfenicol	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S
	Nitrofurantoína	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
	Imipenema	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Levofloxacina	S	R	I	S	S	S	R	I	S	S	S	S
	Cefazolina	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	% de resistências	**10,5**	**21,0**	**36,8**	**26,3**	**21,0**	**21,0**	**31,6**	**26,3**	**0,0**	**5,3**	**21,0**	**0,0**

Com recurso uma técnica peculiar para recolha da flora microbiana presente nas mãos dos manipuladores (lavado de mãos), obtiveram-se isolados de *S. aureus* e testou-se a sua sensibilidade aos antimicrobianos (Quadro 6). As resistências à Penicilina G (73%) e aos macrólidos Azitromicina (45%) e Eritromicina (45%) foram as mais frequentemente detetadas. Não se registaram resistências aos aminoglicosídeos (Gentamicina e Tobramicina), bem como às cefalosporinas de 2ª e 5ª geração.

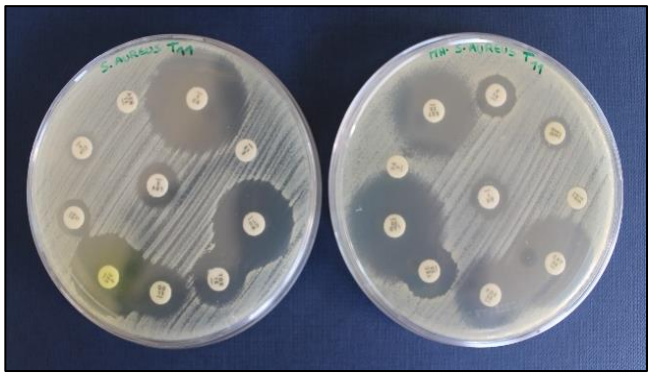
Quadro 6. Susceptibilidade aos antimicrobianos em *S. aureus isolados* nas mão dos manipuladores; Legenda: S- sensível; I-intermédio; R-resistente.

	Data	18/11/2019	18/11/2019	18/11/2019	22/11/2019	22/11/2019	29/11/2019	29/11/2019	05/12/2019	05/12/2019	12/12/2019	22/01/2020
	Identificação	T3MaoRC	T3MaoRE	T4Mao	T6Mao	T7Mao	T8Mao	T9Mao	T10Maо	T11Maо	T13Maо	T21Maо
	Talho	3	3	4	6	7	8	9	10	11	13	21
Antibióticos	**Penicilina G**	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
	Cefoxitina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	Ceftarolina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Teicoplanina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Azitromicina	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R
	Eritromicina	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R
	Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	Doxiciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	Levofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	Nitrofurantoína	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Clindamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
	Sulfametoxazol + Trimetropim	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	Rifampicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Oxacilina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	Quinupristina dalfopristina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	Linezolida	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	% de resistências	**0,0**	**20,0**	**5,0**	**5,0**	**5,0**	**5,0**	**5,0**	**10,0**	**60,0**	**15,0**	**15,0**

Nesta vertente do trabalho sobressaiu um isolado (T11Mão) resistente à meticilina (MRSA, sigla inglesa para *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina). Segundo Peres & Pina (2011), as estirpes MRSA têm sido consideradas o principal agente causador de infeções hospitalares. Neste particular, obteve-se o esclarecimento junto do operador em causa sobre se tinha estado em

ambiente hospitalar, o que foi pelo mesmo confirmado, embora também seja frequente encontrar isolados MRSA em suínos e nas respetivas carnes (Smith *et al*.,2009).

Na perspetiva *One health*, é essencial incrementar a capacidade de prevenir infeções e a disseminação de bactérias resistentes no ambiente. Para alcançar esse desiderato, mostra-se necessário melhorar o controlo de infeções, cuidados de higiene, criação animal e a uma vacinação eficaz e segura (Collignon, 2013).



Fotografia 4- Antibiograma de um MRSA das mãos do operador do talho #11 (arquivo pessoal).

***Cadeia de frio* e pH da carne**

O Regulamento n.º 852/2004 prescreve que *a cadeia de frio deve ser sempre mantida para todos os géneros alimentícios que permitam a reprodução de microrganismos patogénicos ou formação de toxinas a temperaturas de que possam resultar riscos para a saúde.*

Neste requisito, verificou-se um incremento médio da temperatura de 4,6 ºC (Quadro 4) resultante da operação tecnológica de picagem e, muito provavelmente, da excessiva manipulação da carne (*e.g.* seleção da quantidade pretendida pelo consumidor) e do não cumprimento do preceito legal (alínea c) do ponto 6 do artigo 13.º do Decreto-Lei n.º 147/2006), que impõe a colocação da cabeça da picadora no frio, sempre que esta operação tecnológica não esteja a ser realizada.

Importa sublinhar que o aumento da temperatura associado à picagem da carne foi muito contrastante nos diferentes estabelecimentos, oscilando entre 0,6ºC e 8,8ºC. Em 15 dos talhos avaliados a temperatura da carne após a operação de picagem encontrava-se acima do valor fixado na legislação (2 ºC, *Cf*.Decreto-Lei n.º 147/2006). Curiosamente, nos estabelecimentos em que a carne antes de ser picada se encontrava abaixo de 3 ºC os valores médios de contaminação por AMT e *E. coli* foram respetivamente de $5{,}4x10^7$ e $1{,}3x10^3$ UFC/g, enquanto nos talhos em que a

carne se encontrava acima de 3 ºC se obtiveram cargas contaminantes médias de $5{,}9x10^7$ e $3{,}1x10^3$ UFC/g para AMT e *E. coli*, respetivamente.

No Quadro 7 são indicadas as temperaturas mínimas, médias e máximas atingidas em cada câmara de refrigeração durante um período de monitorização de sete dias, com leituras efetuadas em intervalos de 20 minutos através de *dataloggers*.

Quadro 7. Temperatura mínima, média e máxima registadas na câmara de refrigeração de cada estabelecimento através de uma monitorização por *dataloggers* (Hanna). Encontram-se destacados a rosa os valores superiores à temperatura legalmente exigida que, devido ao armazenamento de miudezas de ungulados, deveria ser inferior a 3ºC.

Talho	**Temperatura da câmara de refrigeração ºC**			**Duração da temperatura máxima (horas)**
	Temperatura mínima	**Temperatura média**	**Temperatura máxima**	
1	4,7	5,0	6,2	0,3
2	3,1	3,6	4,8	0,3
3	5,4	5,8	6,3	14,0
4	0,9	2,2	5,1	0,3
5	-0,6	1,7	4,5	0,3
6	0,7	2,1	4,4	0,3
7	-0,9	1,1	2,6	0,3
8	0,9	1,8	4,8	0,3
9	0,7	1,7	3,4	1,0
10	2,3	3,7	7,0	0,3
11	2,9	4,1	6,2	0,3
12	0,0	2,3	7,0	0,6
13	-0,6	1,2	4,2	0,3
14	1,3	1,3	7,6	0,3
15	0,7	2,0	3,2	0,3
16	1,9	2,8	6,2	0,3
17	0,0	1,0	2,7	0,3
18	-0,1	1,5	4,1	0,3
19	-3,4	0,1	1,2	0,3
20	1,9	2,3	3,1	0,6

De acordo com as alíneas b) e c) do n.º 2 do artigo 10.º do Decreto-Lei nº 147/2006 de 31 de julho, *os produtos com diferentes temperaturas internas exigidas colocados no mesmo meio devem estar sujeitos à temperatura mais baixa*. Atendendo a que nas câmaras de refrigeração existiam vísceras de ungulados, a temperatura deveria estar regulada para um valor igual ou inferior a 3ºC. Globalmente, os valores merecem apreciação positiva. A temperatura média encontrava-se abaixo

do exigido em 15 dos 20 talhos avaliados e, em nenhum dos cinco estabelecimentos que não cumpriram este requisito se registaram valores de temperatura média superior a 7ºC. A análise sumária dos valores não parece evidenciar a existência de uma relação direta entre a temperatura média a que as carnes são conservadas e o número de microrganismos totais (AMT) ou de *E. coli* detetados nas carnes picadas. Assim, parecem ser o nível de higiene da superfícies e, eventualmente, o tempo de armazenagem (pós abate) e a qualidade higiénica da carne adquirida pelos talhos, os principais fatores a influenciarem os parâmetros microbiológicos da carne.

No respeitante à medição dos valores de pH nas amostras de carne picada, obteve-se um valor médio de 5,7, um mínimo de 5,5 e um máximo de 6,2. Segundo Leite e colaboradores (2015) é aceitável um intervalo de valores entre 5,5 e 6,0 para o pH da carne de bovino. Apenas a amostra de carne picada recolhida no talho #9, apresentou um valor de pH superior, talvez por já ter sido aditivada com *Pimursa*® (salschibas). Na medição do pH desta mistura de aditivos registou-se um valor de 6,27.

IV. Conclusão

A atividade inspetiva descrita no presente trabalho implicou a execução de vários procedimentos nos estabelecimentos visitados, desde a observação das respetivas instalações e *modus operandi* dos intervenientes até à fase final do controlo microbiológico, passando nesse *interim*, pela necessária comunicação com aqueles, os quais disponibilizaram documentação pertinente. As condicionantes deste ramo de atividade incidiram sobre a falta de formação em matéria de higiene, o insuficiente conhecimento da legislação aplicável e a reduzida interação com as empresas de assessoria técnica.

Do lado do controlo oficial, é benéfico que se continue o esforço para uniformizar os procedimentos de verificação nos diferentes operadores. Esta é a direcção certa para assegurar um elevado nível de proteção da saúde pública e, igualmente importante, para promover a equidade concorrencial.

Nos Estados Unidos da América, a *Food and Drug Administration* concebeu um manual de procedimentos para a uniformização dos controlos oficiais em matéria de segurança alimentar do comércio a retalho. Nesse documento preconiza que essa estratégia é crucial para assegurar a certificação, a segurança e a genuinidade dos géneros alimentícios comercializados. Com vista a alcançar os referidos objetivos, os inspetores oficiais são submetidos a uma avaliação por um superior hierárquico no decurso de uma inspeção regular em matérias de risco associados à alimentação, ao código alimentar e de boas práticas, à comunicação e ao HACCP. O manual de norte-americano descreve pormenorizadamente a forma como cada inspetor deve, em cada auditoria, preencher a *lista de verificação* (Quadro 8), exemplificando sempre com situações de campo. Concretamente, elenca uma série de instruções através das quais o inspetor fica habilitado a completar rigorosamente as *(in)conformidades* detetadas bem como a identificar os casos de *não aplicabilidade* e de *não verificação* (FDA, 2015).

No nosso país, existe já uma lista de verificação. No entanto, apesar de incidir na generalidade sobre os mesmos parâmetros, carece ainda de uniformização. Os benefícios resultantes de uma maior uniformização dos controlos oficiais, especificamente no respeitante à segurança e higiene dos géneros alimentícios, fundamentam a convicção no sentido de ser aconselhável a implementação de um procedimento mais uniforme.

Quadro 8. Descrição das áreas de atuação no âmbito das quais os inspectores oficiais são avaliados para efeitos do processo de estandardização norte-americano.

Área de atuação	Parâmetros
Fatores de risco de doença alimentar	• Rastreabilidade de matérias primas • Cadeia de frio • Higiene do pessoal • Contaminação cruzada
Código Alimentar	• Adequado conhecimento do código alimentar • Saúde do pessoal • Informação ao consumidor • Risco de contaminação na manipulação
Código de boas práticas	• Qualidade da água • Rotulagem • Controlo das temperaturas • Estruturas e equipamentos • Controlo de fontes de contaminação
HACCP	• Existência de um plano HACCP • Aplicação do plano de HACCP • Fluxogramas • Plano de controlo de riscos
Comunicação e equipamento	• Comunicação com o responsável do estabelecimento e os restantes funcionários • Uso de esquipamento adequado

A defesa de um nível de excelência relativo à segurança e à qualidade do género alimentício deverá constituir a *pedra angular* do comércio de carnes a retalho de modo a estabelecer, cada vez mais, uma relação de confiança com o consumidor.

Por último, a preferência dos consumidores pelos produtos vendidos nos talhos e consequente aumento do consumo de carne proveniente da indústria nacional, influencia, de forma favorável, a economia nacional mais propriamente do setor agroalimentar.

V. Referências Bibliográficas

Al-mutairi, M. F. (2011) "The Incidence of Enterobacteriaceae Causing Food Poisoning in Some Meat Products" **Advance Journal of Food Science and Technology,** *3*(2), 116–121.

ASAE. (n.d.) "Staphylococcus aureus" Retrieved from https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus.aspx

Brin, L., Zarazaga, M., Sa, Y., Ruiz-larrea, F., & Torres, C. (2002) "Lactamases in Ampicillin-Resistant Escherichia coli Isolates from Foods , Humans , and Healthy Animals"**Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, *46*(10), 3156–3163. https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3156

Carpentier, B., Cerf, O. (2011) "Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises" **International Journal of Food Microbiology**, *145*(1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012) **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standard — Eleventh Edition** (11th ed., Vol. 32).

Collignon, P. (2013)"The Importance of a One Health Approach to Preventing the Development and Spread of Antibiotic Resistance" **Current Topics in Microbiology and Immunology**, *366*(June 2012), 19–36. https://doi.org/10.1007/82

Comunicação da Comissão (2016/C 278/01) sobre a implementação de sistemas de gestão da segurança alimentar que abrangem programas de pré-requisitos (PRP) e procedimentos baseados nos princípios HACCP, incluindo a facilitação/ /flexibilidade de implementação em determinadas empresas do setor alimentar

Davies, J., & Davies, D. (2010) "Origins and Evolution of Antibiotic Resistance" **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, *74*(3), 417–433. https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10

Decisão da Comissão (2001/471/CE) de 8 de Junho de 2001 que estabelece regras para os controlos regulares à higiene geral efectuados pelos operadores aos estabelecimentos.

Decreto-Lei n.º 147/2006 de 31 de Julho. **Diário da República n.º 146/2006, Série I de 2006-07-31**. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa

Decreto-Lei n.º 116/98 de 5 de Maio. **Diário da República n.º 103/1998, Série I-A de 1998-05-05.** Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas

Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2014) "(P20) Plano de Aprovação e Controlo dos Estabelecimentos (PACE)" **Planos PNCPI 2012-2014**, 275–285.

Doyle, M., Buchanan, R. (2012). **Food Microbiology** (4th ed.).

Food and Drug Adiminstration (2015) "FDA Procedures for Standardization of Retail Food Safety Inspection Officers"**U.S. Public Health Service**

Grunert, K. G. (2005) "Food quality and safety : consumer perception and demand" **European Review of Agricultural Economics**, *32*(3), 369–391. https://doi.org/10.1093/eurrag/jbi011

Íris, A., Coelho, M., Célia, R., & Miranda, R. (2010) "Microbiological contamination of environments and surfaces at commercial restaurants" **Ciência & Saúde Coletiva,** *15*, 1597–1606.

ISO 4833:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Colony-count technique at 30 degrees C [Internet]. [cited 2017 Jul 15]. Disponível em: https://www.iso.org/standard/34524.html

ISO 21528-2:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -- Part 2: Colony-count method [Internet]. [cited 2017 Jul 15]. Disponível em: https://www.iso.org/standard/34566.html

ISO/TS 16649-3:2005 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli -- Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide [Internet]. [cited 2017 Jul 15]. Disponível em: https://www.iso.org/standard/40235.html

ISO 6579:2002 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of Salmonella spp. [Internet]. [cited 2017 Jul 15]. Disponível em: https://www.iso.org/standard/29315.html

ISO 11290-1:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogens. Part 1. Detection method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 1996.

ISO 16649-2:2001 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli -- Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronid [Internet]. [cited 2017 Jul 15]. Disponível em: https://www.iso.org/standard/29824.html

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (2019) "Interpretação de resultados de ensaios microbiológicosem alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: valores-guia." Lisboa: INSA IP, 2019. Disponível online em: http://repositorio.insa.pt//handle/10400.18/5610

Leite, Claudesina; Nascimento, Mara; Santana, Daniela; Guimarães, Ednaldo; Morais, H. (2015) "Influência do manejo pré-abate de bovinos na indústria sobre os parâmetros de bem-estar animal e impactos no pH 24 horas post-mortem" **Biosci. J**., *31*(1), 194–203.

Litz, V. D. M., Rodrigues, L. B., & Pilotto, F (2007) "Anti-sepsia de mãos na indústria de carnes : avaliação da clorhexidina , triclosan e iodóforo na redução da contaminação microbiana em manipuladores" **Acta Scientiae Veterinariae**, *35*(July), 321–326.

Lues, J. F. R., & Tonder, I. Van. (2007) "The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group" **Food Control**, *18*, 326–332. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.010

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., & Poggiu, A. (2005) "Coagulase-positive Staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy."

International Journal of Food Microbiology, *98*, 73–79. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.008

NP 4400-1:2002 (2002) "Microbiologia alimentar; Regras gerais para contagem de estafilococos coagulase positiva (Staphylococus aureas e outras espécies)", Parte 1, Instituto Português da Qualidade.

NP 4405:2002 (2002), "Microbiologia Alimentar- Regras gerais para a contagem de microrganismos; Contagem de colónias a 30°C", Instituto Português da Qualidade.

Peres, D., & Pina, E. (2011) "Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) in a Portuguese hospital and its risk perception by health care professionals" **Revista Portuguesa de Saúde Pública,** *29*(2), 132–139.

Queico, C., & Leite, F. (1988) "Staphylococcus aureus: portadores entre manipuladores de alimentos". **Saúde Pública,** (Xiv), 36–40.

Regulamento (CE) N.º178/2002, de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. 2002;44.Jornal Oficial da União Europeia

Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia 2005

Regulamento (CE) N.º852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004.relativo à higiene dos géneros alimenticios. Jornal Oficial da União Europeia. 2004;3:1–25

Santos, M., Castro, V. De, Pinto, C. De, Santos, G., Freitas, E., Fonsêca, F. C., … Nascimento, A. A. (2017) "Quality physicochemical and microbiological of beef meat in butchers" **REDVET - Revista Electrónica de Veterinaria**, *18*, 1–13.

Smith, T. C., Male, M. J., Harper, A. L., Kroeger, J. S., Tinkler, G. P., Erin, D., … Diekema, D. J. (2009). "Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Strain ST398 Is Present in Midwestern U . S . Swine and Swine Workers." **Plos One**, *4*(1), 1–6.

Stiles, M. E. & Ng, L. (1981) "Enterobacteriaceae Associated with Meats and Meat Handling" **Applied and Enviromental Microbiology**, *41*(4), 867–872.

Tamagnini, L. M., Olmos, P. D., Sousa, G. B. De, & Gonz, R. D. (2003) "Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and Escherichia coli determination in ready-to-eat foods" **Food Microbiology**, *20*, 601–604. https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00178-8

Temelli, S. (2006) "Determination of microbiological contamination sources during frozen snail meat processing stages" **Food Control,** *17*, 22–29. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.08.004

Standards Unit Microbiology Services (2013). "UK Standards for Microbiology Investigations". **Public Health England.**