

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS CONTROLES MICROBIOLÓGICOS E
DO PROGRAMA DE REDUÇÃO DE PATÓGENOS NO
ABATE DE BOVINOS.**

Kelly Caselani

Orientador: Prof. Dr. Luiz Francisco Prata

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Agosto de 2010

C386a Caselani, Kelly
Avaliação dos controles microbiológicos e do programa de
redução de patógenos no abate de bovinos / Kelly Caselani. --
Jaboticabal, 2010
xi, 123 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Luiz Francisco Prata

Banca examinadora: Gener Tadeu Pereira, Anna Monteiro
Correia Lima Ribeiro

Bibliografia

1. Bovino. 2. Contagem Bacteriana Total. 3. *Escherichia coli*. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KELLY CASELANI – Natural de São José dos Campos – SP, nascida em 31 de agosto de 1983. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – UFU em 2003, graduando-se em março de 2008 após estágio curricular no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Carnes – CTC / ITAL. Durante o curso de graduação, realizou trabalho de iniciação científica na área de saúde pública veterinária com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Em 2008, iniciou o curso de Mestrado no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP, com bolsa CNPq.

Dedico...

*Aos meus pais, **Umberto** e **Alda**, pelo apoio e amor incondicionais em todos os momentos da minha vida. O resultado desse trabalho não seria possível sem vocês!*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, em primeiro lugar, pelo dom da vida e por sempre iluminar o meu caminho.

Ao **Prof. Dr. Luiz Francisco Prata**, pela orientação, paciência, confiança e, sobretudo, pelos ensinamentos passados.

À **Paula, Tânia** e todos os funcionários do **Frigorífico Minerva**, pela receptividade, paciência, ensinamentos e por tornar possível a realização desta pesquisa.

À **Prof. Dr. Anna Correia Lima Ribeiro**, pelos conselhos, receptividade, sugestões na conclusão do presente trabalho e, principalmente pela amizade desde a graduação.

Ao **Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira**, pelo auxílio com as análises estatísticas, colaborando na parte final do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antonio Sergio Ferraud**, pelo incentivo, apoio e amizade.

Ao **Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal**, nas pessoas de seus professores e funcionários.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias** - Unesp - Campus de Jaboticabal, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

Aos amigos de Jaboticabal **Andréa, Carol, Cíntia, Giovanni, Ingrid, Ivana, Laura, Manuela, Renata, Samantha** e **Vânia**, por fazerem melhores os momentos vividos aqui.

Ao meu futuro marido **Rômulo**, pelo amor incondicional, incentivo e companheirismo ao longo de todos estes anos juntos.

Aos meus familiares, em especial, minha avó **Maria**, minha sogra **Juliana** e minha segunda avó **Hélia**, pelo apoio e carinho.

Aos eternos amigos **Ana Flávia, Cris, Fran, Hiuriky, Jú, Letícia, Ludmila, Lilia, Maíra, Mirelle e Willian**, pelo carinho, cumplicidade e amizade.

Ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro.

A **todos**, que direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento e finalização do trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Controles Operacionais e Qualidade da Carne.....	4
2.1.1 Microrganismos Indicadores.....	9
2.1.2 Análises Laboratoriais.....	15
2.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	16
2.2. Principais Patógenos Monitorados no Abate de Bovinos.....	18
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	18
EHEC (<i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica).....	19
2.2.2 <i>Listeria</i> sp.....	27
2.2.3 <i>Salmonella</i> sp.....	33
III. OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Colheita das amostras.....	46
4.1.1 Amostras de ambiente.....	46
Superfícies de contato.....	46
Pesquisa de <i>Listeria</i>	46
4.1.2 Amostras de superfície de carcaças.....	47
4.1.3 Amostragem comparativa.....	49

	Página
4.1.4 Amostras de recortes cárneos.....	50
4.2 Enumeração de microrganismos indicadores pelo método Petrifilm	50
4.2.1 Preparo das amostras para análise.....	50
4.2.2 Petrifilm™.....	51
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (DUPONT QUALICON, 2005).....	52
4.3.1 Preparo das amostras para análise.....	52
4.3.2 Bax® System.....	53
4.4 Critérios para interpretação dos resultados.....	53
4.5 Análise Estatística.....	55
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Controles Operacionais e Ambientais.....	56
5.1.1 Controle das Superfícies de Contato com Alimentos.....	56
Contagem Bacteriana Total.....	56
<i>Listeria</i> spp.....	65
5.2 Controles Higiênicos na obtenção das Carcaças.....	73
<i>E. coli</i>	73
Amostragem Comparativa.....	77
Recortes cárneos.....	88
VI. CONCLUSÕES.....	89
VII. REFERÊNCIAS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

- APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
- AR – Análise de Risco
- BPW – “Buffered Peptone Water”
- CBT – Contagem Bacteriana Total
- CDC – “Centers for Disease Control and Prevention”
- CH – Colite Hemorrágica
- CT – Coliformes Totais
- DAEC – *Escherichia coli* difusamente aderente
- EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa
- EHEC – *Escherichia coli* entero-hemorrágica
- EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva
- EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica
- ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
- FSA – “Food Standars Agency”
- NASA – “National Aeronautics and Space Administration”
- PPHO – Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional
- PTT – Púrpura Trombocitopênica Trombótica
- SHU – Síndrome Hemolítico-Urêmica
- SLT – “Shiga-like toxin”
- STEC – *Escherichia coli* Shigatoxigênica
- Stx1 – “Shiga toxin 1”
- Stx2 – “Shiga toxin 2”
- TEC – “Total *Enterobacteriaceae* Count”
- TSB – “Tryptic Soy Agar”
- TVC – “Total Viable Count”
- VT – verotoxina

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Esquema de interpretação dos resultados de diferentes métodos de análise de carcaça, de acordo com critérios internacionais estabelecidos pela “Food standards Agency” – UK, 2005. Barretos-SP, 2010.....	54
Tabela 2. Resultados da Contagem Bacteriana Total (CBT) em amostras de superfícies de contato com alimentos variadas, nos diferentes setores do estabelecimento de abate segundo Decisão 2001/471/CE. Barretos-SP, 2010.....	57
Tabela 3. Resultados da Contagem Bacteriana Total (CBT) em amostras de superfícies de contato com alimentos variadas, nos diferentes setores do estabelecimento de abate segundo Decisão 2001/471/CE. Barretos-SP, 2010.....	59
Tabela 4. Resultados das análises ambientais de <i>Listeria spp.</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> , em diferentes setores do estabelecimento de abate. Barretos-SP, 2010.....	66
Tabela 5. Resultados das análises de amostras ambientais para a presença de <i>Listeria spp.</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> , nas diferentes superfícies do estabelecimento de abate. Barretos-SP, 2010.....	72
Tabela 6. Resultados das análises de <i>E. coli</i> em carcaças refrigeradas de novembro de 2008 a outubro de 2009, segundo critérios internacionais estabelecidos pela “Food Standards Agency” – UK, 2005. Barretos-SP, 2010.....	75
Tabela 7. Resultados de diferentes métodos de análise de acordo com critérios internacionais estabelecidos pela “Food Standards Agency” – UK, 2005. Barretos-SP, 2010.....	78

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Locais aproximados das carcaças onde foram colhidas as amostras.....	48
Figura 2. Resultados comparativos das condições de todas as superfícies de contato com alimentos amostradas mensalmente e determinadas pela CBT, durante o período de um ano.....	57
Figura 3. Resultados da CBT em superfícies de contato com alimentos de acordo com os períodos do ano (chuvoso e seco) (EP: Erro Padrão).	58
Figura 4. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de abate, durante o período de um ano.....	61
Figura 5. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de cortes, durante o período de um ano.....	61
Figura 6. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de desossa, durante o período de um ano.....	62
Figura 7. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de miúdos comestíveis, durante o período de um ano.....	63
Figura 8. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de conservas, durante o período de um ano.....	64
Figura 9. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de porcionados, durante o período de um ano.....	65

	Página
Figura 10. Resultados mensais da pesquisa de <i>Listeria</i> spp. e de <i>Listeria monocytogenes</i> nos diferentes locais amostrados, durante o período de um ano.....	67
Figura 11. Resultados da pesquisa de <i>Listeria</i> em superfícies, de acordo com os períodos do ano (chuvoso e seco).....	68
Figura 12. Resultados mensais da pesquisa da ocorrência de <i>Listeria</i> nas amostras do setor de abate.....	69
Figura 13. Resultados mensais da pesquisa da ocorrência de <i>Listeria</i> nas amostras do setor de câmaras.....	70
Figura 14. Resultados mensais da pesquisa da ocorrência de <i>Listeria</i> nas amostras do setor de desossa.....	70
Figura 15. Resultados mensais da pesquisa da ocorrência de <i>Listeria</i> nas amostras do setor de conserva.....	71
Figura 16. Resultados mensais da pesquisa da ocorrência de <i>Listeria</i> nas amostras do setor de cortes.....	72
Figura 17. Resultados mensais da estimativa de <i>E. coli</i> em superfície de carcaças resfriadas de acordo com o padrão de interpretação, para o período de um ano.....	76
Figura 18. Resultados da estimativa de <i>E. coli</i> em superfície de carcaças resfriadas de acordo com os períodos do ano (chuvoso e seco) (EP: Erro Padrão).....	76
Figura 19. Distribuição dos resultados da CBT das amostras de superfície das carcaças quentes, respectivamente para animais de terminação a pasto e de terminação confinada.....	79
Figura 20. Distribuição dos resultados da estimativa de Coliformes Totais das amostras de superfície das carcaças resfriadas, respectivamente para animais de terminação a pasto e de terminação confinada.....	83

	Página
Figura 21. Distribuição dos resultados da estimativa de <i>E. coli</i> em amostras de superfície das carcaças resfriadas, respectivamente para animais de terminação a pasto e de terminação confinada.....	84

AVALIAÇÃO DOS CONTROLES MICROBIOLÓGICOS E DO PROGRAMA DE REDUÇÃO DE PATÓGENOS NO ABATE DE BOVINOS.

RESUMO – Este trabalho teve por finalidade avaliar o resultado dos controles ambientais e operacionais, rotineiros e derivados do plano APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, aplicados ao abate de bovinos, e da pesquisa de microrganismos potencialmente patogênicos (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*). Com duração de um ano, a pesquisa foi desenvolvida em abatedouro-frigorífico habilitado à exportação localizado no Estado de São Paulo, Brasil. Foram analisadas 411 amostras ambientais para pesquisa de *Listeria* spp., 1.192 amostras de superfície de contato para a Contagem Bacteriana Total (CBT), 200, 100, 775, 264 e 100 amostras de superfície de carcaça para CBT, Coliformes totais, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7, respectivamente, além de 256 amostras de recortes cárneos para a pesquisa de *E. coli* O157:H7. Os resultados evidenciaram condição higiênica aceitável para 51,1% das amostras ambientais de CBT, com 62,9% de amostras não aceitáveis no setor de abate. Um valor elevado de amostras (15,1%) foi positivo para *Listeria* spp. e para *Listeria monocytogenes* (4,6%). Observou-se que 89,6%, 2,8% e 7,6% das amostras de carcaça foram satisfatórias, aceitáveis e insatisfatórias para *E. coli*, respectivamente. Para a amostragem comparativa, 88,5% das amostras apresentaram-se satisfatórias para CBT, 84% para Coliformes Totais e 83,6% para *E. coli*. Nenhuma das amostras de carcaça analisadas foi positiva para *Salmonella* spp. ou para *E. coli* O157:H7. A frequência da ocorrência de *E. coli* O157:H7 em amostras de recortes cárneos (carne industrial) foi de 0,31%, com apenas uma amostra positiva.

Palavras-chave: Bovino, Coliformes Totais, Contagem Bacteriana Total, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF CONTROLS AND PROGRAM PATHOGEN REDUCTION IN SLAUGHTER OF CATTLE.

SUMMARY – This study aimed to evaluate the result of the environmental and operational controls which are routine or derived from HACCP Plan - Hazard Analysis and Critical Control Points, applied to slaughter cattle, and potentially pathogenic microorganisms research (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*). During one year, the research was developed in a slaughterhouse, enabled to export, located in the state of São Paulo, Brazil. We analyzed 411 environmental samples for *Listeria* spp. research, 1.192 samples of surface contact for Total Bacterial Count (TBC), 200, 100, 775, 264 and 100 samples of carcass surface for TBC, Total Coliform, *E. coli*, *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7, respectively, besides 256 samples of meat cuts for *E. coli* O157:H7 research. The results showed that 51,1% of the environmental samples of TBC were in acceptable hygienic condition and 62,9% of samples were not acceptable in the slaughter industry. A high value of samples (15,1%) was positive for *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* (4,6%). It was observed that 89,6%, 2,8% and 7,6% of the samples of carcass were satisfactory, acceptable and unsatisfactory for *E. coli*, respectively. For comparative sampling, 88,5% of the samples were satisfactory for TBC, 84% for Total Coliform and 83, 6% for *E. coli*. None of the samples of carcass tested was positive for *Salmonella* spp. or *E. coli* O157:H7. The frequency of the occurrence of *E. coli* O157:H7 in samples of meat cuts (meat industry) was 0,31%, with only one positive sample.

Keywords: Cattle, Total Coliform, Total Bacterial Count, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*

I. INTRODUÇÃO

Os problemas envolvendo a segurança de consumo da carne, ocorridos nas últimas décadas, ainda estão na memória dos consumidores. Por sua seriedade, gravidade e até mesmo novidade em relação à causa e efeito, foram capazes de promover impacto sobre a sociedade, sobre o comércio mundial de alimentos e principalmente sobre a comunidade científica, impondo um novo paradigma para a oferta de alimentos. Esse novo modelo, mais abrangente e contemplando com medidas preventivas a maior parte das preocupações higiênico-sanitárias, foi imposto pela própria Organização das Nações Unidas - ONU como condição necessária ao comércio internacional a partir do ano de 2000, tornando-se mundialmente conhecido como “Programa Alimento Seguro”.

Adicionalmente às exigências e controles anteriormente praticados, foi eleita uma série de outras práticas e procedimentos, agora adequada e dirigida a todos os segmentos envolvidos das cadeias produtivas, cada qual com suas novas tarefas, compromissos e responsabilidades, num modelo baseado na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e na Análise de Risco (AR). Em todo o mundo, ainda constitui um modelo em desenvolvimento, cujas prática e experiência ainda estão longe de ser consideradas consolidadas.

Por outro lado, a intensificação da produção de bovinos no Brasil é notória, principalmente durante a última fase do sistema – a da terminação ou engorda. Enquanto fenômeno progressivo, mas recente, ainda está sujeito a práticas empíricas e tecnicamente indesejáveis, inadequadas ou impróprias, que são representadas tanto por inadequação de áreas e instalações para a contenção dos animais, quanto pela sobrecarga da densidade populacional em ambientes sem controle e conforto, por práticas de alimentação não previamente planejadas, com mudanças de princípios e dietas, modificando a fisiologia digestiva e o trânsito gastrintestinal – modificando também a aparência e textura das fezes, pela falta de cuidados essenciais de profilaxia – falta de quarentena, mistura de animais de diferentes procedências, etc, com inadequação de manejo, entre outras.

Essa ausência de gestão técnica se traduz em problemas de ordens diversas, seja pelas alterações fisiológicas e comportamentais impostas ou mesmo pelas deficiências sanitárias, profiláticas, de higiene e de manejo. Importante de tudo isso é que mantém os animais em permanente estado de estresse e, portanto, de maior vulnerabilidade às condições oportunistas.

Esse instantâneo ocorre justamente no momento em que se acirram as necessidades de controles emanados dos manuais de produção de alimentos seguros. Enquanto normas disciplinadoras, elas têm caráter impositivo àquela parcela de produção cujo objetivo é a exportação de carnes e, especificamente para o segmento de produção de animais, se traduz por normas de Boas Práticas Agropecuárias, além dos conceitos de produção limpa, preservação do meio ambiente e sustentabilidade.

As referidas práticas, além do desacordo e falta de sintonia quanto às exigências de mercado, impõem outros problemas ao processo de obtenção de carnes com qualidade: principalmente o manejo de animais estressados e suas conseqüências e a condição de animais sujos no momento do abate, advinda de animais de cruzamento, com pêlos mais longos e por acúmulo de sujidade e fezes aderidos à pele.

A título de exemplo – vindo do principal cliente das exportações brasileiras, na União Européia há classificação prévia dos animais quanto à sujeira e umidade da pele em cinco diferentes categorias, três delas impondo restrições à aceitação dos animais para o abate. Obviamente essa não é uma atitude isolada ou sem fundamentos, significando a possibilidade de transferência de eventuais patógenos da pele para as carcaças durante as operações de abate.

No abate de bovinos, esse novo modelo inseriu uma série de controles rotineiros objetivando respaldar as práticas executadas e corrigir em tempo hábil possíveis problemas antes mesmo que eles se efetivem. Mesmo assim, são recentes e com resultados confinados aos próprios locais de execução ou nas próprias empresas, pouco divulgados ou conhecidos enquanto experiências que necessitam ser francamente compartilhadas de acordo com os preceitos da Análise de Risco.

Em função da existência bem definida de dois momentos distintos – um no qual prevalece o abate de animais terminados a pasto e outro no qual prevalece o de

animais confinados, este trabalho se propôs a avaliar o comportamento rotineiro dos controles ambientais e operacionais durante o abate de bovinos, tanto pela utilização de técnicas microbiológicas indicadoras quanto pela monitoração da ocorrência de patógenos específicos, pelo período de um ano, de novembro de 2008 a outubro de 2009.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controles Operacionais e Qualidade da Carne

A carne é um dos alimentos mais importantes, tanto pelo seu valor nutricional como pelo seu valor sensorial. É o alimento básico para suprir as necessidades de proteínas de alta qualidade (PRÄNDL et al., 1994). No Brasil, a carne bovina é item importante da dieta da população e apresenta um dos maiores potenciais de crescimento. O grupo de pessoas de renda elevada tem taxas de consumo semelhantes às dos maiores consumidores mundiais, mais de 50 kg/hab./ano, enquanto as camadas de baixa renda têm consumo de terceiro mundo, com menos de 10 kg/hab./ano. A disponibilidade interna situa-se em torno de 34 kg/hab./ano (ZEN, 2004).

Em 2008, o Brasil liderou o “ranking” dos maiores exportadores de carne bovina no mundo, somando o volume de 2,2 milhões de toneladas em equivalente carcaça, com receita cambial de US\$ 5,3 bilhões. Estes valores representaram uma participação de 28% do comércio internacional, exportando para mais de 170 países. A extensão territorial e as condições climáticas, os programas voltados para a sanidade animal e segurança do alimento posicionam o Brasil como um dos maiores produtores de carne bovina e com potencial para atender às exigências específicas de mercado (ABIEC, 2009).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostraram que o rebanho bovino brasileiro atingiu 205,9 milhões de cabeças em 2006. O país é o detentor do segundo maior rebanho de bovinos do mundo, perdendo apenas para Índia (IBGE, 2007). No mesmo ano, foram registrados 1.572.301 estabelecimentos de criação de bovinos, com valor total da produção de R\$ 13.833.578.946,00 (IBGE, 2009b). Até o segundo trimestre de 2009, foram abatidas 13.334.000 cabeças, correspondente a 3.129.383 toneladas (IBGE, 2009a).

A carne bovina é composta de 75% de água, 18% de proteína, 3% de gordura, 1% de carboidratos, 1,5% de cinzas e 1,5% de matéria nitrogenada não protéica

(PRATA & FUKUDA, 2001). Em qualidade, as proteínas da carne são as mais completas por apresentarem um perfeito equilíbrio de aminoácidos essenciais. Constitui-se em uma excelente fonte de lipídios essenciais, de vitaminas do complexo B, como B2 (riboflavina), B6 (piridoxina), niacina, folacina, ácido pantotêmico e principalmente B12 (cobalamina) e dos minerais ferro e zinco numa forma altamente assimilável pelo organismo (FELÍCIO, 2009).

Por outro lado, a carne, assim como seus derivados, tem sido implicada como uma das principais fontes de infecção de origem alimentar e o elo mais importante entre os animais produtores de alimentos e o homem (MAYRHOFER et al., 2004). A carne apresenta uma composição química que a torna excelente meio de cultura. Possui alta atividade de água, é um alimento rico em substâncias nitrogenadas, minerais e fatores de crescimento. Além disso, seu pH é favorável para a maioria dos microrganismos, sendo que a quantidade e os tipos que se desenvolverão na carne dependerão das condições de abate a que o animal foi submetido, das condições de estresse nesse momento, entre outros fatores (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Entre os patógenos que podem contaminar a carne estão o *Clostridium perfringens*, *Staphilococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* verotoxigênica, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolítica*, *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrofila*, além das bactérias deteriorantes (GILL, 1998).

Uma das principais fontes de contaminação da carcaça na indústria da carne é o animal vivo em si, particularmente nos meses de inverno quando os animais são estabulados – para o caso das condições vigentes na Europa (GRACEY & COLLINS, 1992). Peles e pêlos impregnados de sujidades e fezes podem carrear milhões de bactérias aeróbias e anaeróbias para o interior dos ambientes de abate e processamento. Tal contaminação dependerá: do tipo de solo das pastagens; da condição de higiene e limpeza corporal dos animais (banho); da qualidade do ar e presença de poeira; da qualidade da água utilizada na lavagem da carcaça; das condições dos equipamentos e do controle de ambiente nos quais os processos são realizados; dos utensílios (facas, serras e ganchos); dos vários recipientes usados; do equipamento e do próprio pessoal no trabalho; merecendo referência especial a

contaminação por conteúdo gastrintestinal, em virtude da microbiota específica (PARDI et al., 2006).

Sob condições normais, o trato digestivo possui potencialmente a maior e mais perigosa carga bacteriana encontrada no animal. No sistema de engorda, é produzido de 41kg a 45kg de esterco diariamente, estimando-se que 1g de fezes frescas de bovinos contenha mais de um milhão de bactérias (GRACEY & COLLINS, 1992).

Levando em consideração a taxa elevada de germes existentes no conteúdo intestinal, compreende-se que mínimas contaminações com fezes já constituam alterações potenciais nos produtos. As matérias fecais se concentram também em determinados pontos da superfície corporal dos animais de abate, constituindo causa principal da contaminação da carne. Tais regiões corporais são áreas da pele suja por fezes, como extremidades posteriores e especialmente cascos e unhas, e a taxa de germes contida nessa sujidade é de magnitude parecida a do conteúdo intestinal (SINELL, 1994).

Cuidados especiais antes, durante e após a morte dos animais reduzem ao mínimo possível a contaminação inicial, uma vez que a contaminação bacteriana na superfície das carcaças bovinas é uma consequência inevitável da esfolagem e do próprio processamento de abate. Os cuidados devem acompanhar toda trajetória da carne, seja nas câmaras frias, na desossa, no processamento, na armazenagem, no transporte, na distribuição ou no âmbito doméstico (MINIHAN et al., 2003; PARDI et al., 2006).

Para controlar perigos, entre os quais, os microbiológicos, principalmente os microrganismos patogênicos ao ser humano, o Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) foi eleito e incorporado como principal ferramenta de controle (HOGUE et al., 1998). Desde a sua concepção nos anos 30, o programa cresceu tornando-se um método universalmente reconhecido e aceito na garantia da segurança alimentar passando, a partir de 2000, a fazer parte das obrigações para o comércio mundial de alimentos seguros. A crescente e recente preocupação com a segurança alimentar das autoridades de saúde pública, indústrias de alimentos e consumidores em todo o mundo tem sido o grande impulso na aplicação do sistema

APPCC. Esta preocupação foi confirmada por um aumento significativo na incidência de doenças transmitidas por alimentos em muitos países nos últimos anos (WHO, 2007).

O sistema APPCC, como se conhece hoje, foi criado há cerca de 40 anos pelas indústrias químicas da Grã-Bretanha. Nas décadas de 50, 60 e 70, o sistema foi empregado pela Comissão Americana de Energia Atômica para o planejamento de usinas nucleares. No final dos anos 60, a “National Aeronautics and Space Administration – NASA”, nos EUA, sugeriu que o sistema APPCC fosse empregado na produção de alimentos para os vôos espaciais, a fim de minimizar a chance de ocorrência de doenças de origem alimentar nos tripulantes desses vôos. Na década de 70 verificou-se que o programa poderia ter outras aplicações, sendo então empregado em indústrias processadoras de alimentos de baixa acidez e depois em estabelecimentos processadores de carne (DESTRO, 2008).

O sistema pode ser aplicado em toda a cadeia alimentar, desde a produção primária até o consumo final e sua implementação deve ser guiada por evidências científicas quanto aos riscos à saúde humana. Além de promover a segurança alimentar, a implementação do sistema APPCC pode auxiliar na inspeção por parte das autoridades reguladoras, estimulando o comércio internacional (CAC/RCP, 2003).

Recentemente tem se considerado que as práticas de controle decorrentes do sistema APPCC têm sido compreendidas como o meio mais eficaz na prevenção da contaminação microbiana de carcaças durante o abate (BOLTON et al., 2002). Essas práticas intervêm nos estágios do processamento que representam risco plausível de contaminação da carcaça, reduzindo assim o risco de doenças de origem alimentar. Entretanto, para sua monitoração rotineira a utilização de organismos patogênicos é onerosa, demorada e difícil, tornando-se mais conveniente e prática a pesquisa de organismos indicadores, seja de cuidados ou de contaminação microbiológica. A utilização de bons indicadores, universalmente aceitos para finalidades específicas, permite avaliar corretamente o programa APPCC como ferramenta na garantia da segurança sanitária do processo de abate. Todavia, não dispensam a necessidade ou exigência da monitoração, contínua ou periódica, dos principais patógenos envolvidos com problemas alimentares, possibilitando dados microbiológicos adequados para

permitir conclusões confiáveis quanto à eficácia desses programas no controle e na redução desses patógenos de origem alimentar (ICMSF, 1997; ELDER et al., 2000).

Portanto, para o monitoramento microbiológico de carcaças e controles ambientais e operacionais, métodos clássicos e respectivos padrões, como os decorrentes da Contagem Total de microrganismos Viáveis (“TVC”), da estimativa ou Contagem Total de microrganismos Entéricos (“TEC”), ou simplesmente a contagem de *Escherichia coli*, comportam-se como medidas da qualidade higiênica de processos e para verificação da efetividade do sistema APPCC (EC, 2001). Adicionalmente, de acordo com os dados de ARTHUR et al. (2004) evidenciou-se, para essa situação, as relações entre a presença de microrganismos indicadores e sua correlação com a presença de *E. coli* O157:H7, ou seja, justamente aquilo que se espera de um bom indicador.

No Brasil, o Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e o APPCC foram implementados em estabelecimentos envolvidos com o comércio internacional de carnes e produtos cárneos, em razão da maioria dos casos de enfermidades transmitidas por alimentos estarem relacionados com práticas operacionais inadequadas do ponto de vista higiênico-sanitário. Neste contexto, representa um valioso mecanismo auxiliar do sistema clássico de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, particularmente no que se refere ao controle dos perigos relacionados com as chamadas bactérias emergentes (BRASIL, 1997a).

Segundo a Regulamentação de Redução de Patógenos/APPCC, todos os estabelecimentos de abate de bovinos são obrigados a testar suas carcaças para *E. coli* genérica no final do processo de matança, nas câmaras de resfriamento, como um instrumento para verificar o controle de processos (BRASIL, 1997b). Além do teste de *E. coli*, aqueles estabelecimentos integrantes das listas de fornecedores de matéria-prima para os EUA e estados-membro da União Européia, deverão também fazer a coleta de amostra de carcaça após o resfriamento para o teste de *Salmonella*, e antes do resfriamento para a contagem total de viáveis – “TVC” (BRASIL, 2007).

As medidas de controle de *Listeria monocytogenes*, particularmente nos produtos prontos para o consumo, consistem na aplicação de procedimentos que evitam a

contaminação cruzada, fundamentados em programas de controle ambiental (PPHO). Em linhas gerais, os programas das empresas (PPHO), devem contemplar os procedimentos de limpeza e desinfecção, frequência, monitoramento, medidas corretivas/preventivas e verificação através de testes microbiológicos. Com relação ao teste a ser realizado, pode-se executar testes para *L. monocytogenes* ou para *Listeria* spp., que pode ou não incluir a *L. monocytogenes*. Genericamente, há três locais básicos para testes de *Listeria* spp.: ambiente, equipamentos e produto final (BRASIL, 2004).

2.1.1 Microrganismos Indicadores

A presença de microrganismos nos alimentos não significa necessariamente um risco para o consumidor ou uma qualidade inferior desses produtos. Na realidade, excetuando-se o reduzido número de produtos submetidos à esterilização comercial, os alimentos podem conter leveduras inócuas, mofo, bactérias e outros microrganismos. A maior parte dos alimentos torna-se potencialmente perigosa para o consumidor somente após terem sido violados os princípios de higiene, limpeza e desinfecção. Se os alimentos têm estado sujeitos a condições que puderam permitir a entrada e/ou multiplicação de agentes infecciosos ou toxigênicos, podem se constituir em veículo de transmissão de enfermidades (ICMSF, 2000).

Segundo LANDGRAF (2008), microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

A Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1984) agrupou os microrganismos indicadores em duas categorias:

1. Microrganismos que não oferecem risco direto à saúde, mas oferecem uma estimativa acerca de uma condição: como a contagem padrão de mesófilos, as contagens de psicrótróficos, de termófilos, de bolores e leveduras.

2. Microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde e cuja presença pode indicar condições indesejáveis: como as estimativas de coliformes totais, de coliformes fecais ou termotolerantes, de enterococos, enterobactérias totais e de *E. coli*.

Alguns critérios devem ser considerados na definição de um microrganismo ou grupo de microrganismos como um indicador: o mesmo deve ser de rápida e fácil detecção; deve ser facilmente distinguível de outros microrganismos da microbiota do alimento; não deve estar presente como contaminante natural do alimento; deve estar sempre presente quando o patógeno associado o estiver; seu número deve correlacionar-se com o do patógeno alvo; deve apresentar necessidades e velocidade de crescimento semelhantes às do patógeno; deve ter velocidade de morte que seja ao menos semelhante à do patógeno e, se possível, sobrevivência levemente superior à do patógeno; deve estar ausente nos alimentos que estão livres do patógeno, ou estar presente em quantidades mínimas. No entanto, nem sempre todas essas características são conjuntamente possíveis ou observadas (LANDGRAF, 2008).

A estimativa da contagem de bactérias viáveis baseia-se no número de colônias que se desenvolvem nas placas com agar nutritivo, que foram previamente inoculadas com quantidades conhecidas de amostra diluída do alimento e incubadas sob condições previamente determinadas, principalmente de temperatura e tempo. Cada tipo de estimativa de microrganismos viáveis é potencialmente útil para finalidades específicas, como a estimativa de termófilos ou de proteolíticos, mas a contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e facultativas viáveis (CBT ou "TVC") é a análise mais frequentemente utilizada para avaliar a qualidade sanitária dos alimentos (ICMSF, 2000).

A contagem elevada desse grupo de bactérias nos alimentos não perecíveis é indicativa do uso de matéria-prima contaminada ou processamento insatisfatório sob o ponto de vista sanitário. Em alimentos perecíveis pode indicar abuso durante o

armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura (LANDGRAF, 2008). Nos processos de esfolagem e evisceração da carcaça, a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos tem sido usada como indicador de desempenho geral de higiene e contaminação por microrganismos deteriorantes (MACKEY & ROBERTS, 1993).

GILL et al. (1998) avaliaram as performances higiênicas dos processos de esfolagem e evisceração da carcaça bovina e encontraram valores médios para contagem total de mesófilos variando entre 5 e 2 \log_{10} UFC/cm². PHILLIPS et al. (2001), ao analisarem 1.275 carcaças bovinas de frigoríficos de exportação e domésticos, encontraram uma população média de microrganismos viáveis de 2,42 \log_{10} UFC/cm².

Um total de 159 amostras de carcaça bovina refrigerada foi coletado em frigoríficos do sul da Austrália, a fim de desenvolver um perfil microbiológico da carne produzida para o mercado interno. A média para contagem de mesófilos foi de 1,82 \log_{10} UFC/cm² (SUMNER et al., 2003). McEVOY et al. (2004) analisaram carcaças bovinas amostradas em um frigorífico da Irlanda. Após a lavagem das carcaças os valores médios de microrganismos viáveis encontrados foram 3,33 \log_{10} UFC/cm² para região do peito e 3,24 \log_{10} UFC/cm² para região do pescoço. Na Irlanda, PEARCE & BOLTON (2005) não relataram diferença significativa entre os métodos de suabe utilizados em carcaças bovinas, cujas médias variaram entre 1,80 e 1,90 \log_{10} UFC/cm², para CBT com suabe de acetato de celulose e de poliuretano, respectivamente.

Em frigoríficos habilitados à exportação no Brasil, FRANÇA FILHO (2005) obteve como valor máximo de CBT de $5,5 \times 10^4$ UFC/cm² para meias-carcaças bovinas. As médias de microrganismos viáveis em carcaças bovinas obtida pelas técnicas de excisão e suabe, no Reino Unido, apresentaram valores de 2,1 e 1,4 \log_{10} UFC/cm², respectivamente (HUTCHISON et al., 2005). ZWEIFEL et al. (2005), após análise de 800 carcaças bovinas provenientes de frigoríficos de alta capacidade da Suíça, encontraram valores médios para contagem de microrganismos viáveis variando de 2,1 a 3,1 \log_{10} UFC/cm².

TERGNEY & BOLTON (2006) amostraram 180 carcaças bovinas durante os processos de esfolagem e evisceração, isolando cerca de 3,0 \log_{10} UFC/cm² de populações de microrganismos viáveis. McCLEERY et al. (2008), ao analisarem o efeito da

depilação do couro ante e *post-mortem* na qualidade microbiológica de 362 carcaças bovinas, detectaram valores médios para contagem de microrganismos aeróbios variando entre 3,1 \log_{10} UFC/cm² para categoria 1 (animais limpos) e 3,2 (depilado *post-mortem*) e 3,0 (depilado *ante-mortem*) \log_{10} UFC/cm² para categoria 4 (animais sujos).

ZWEIFEL et al. (2008) analisaram 535 carcaças bovinas em frigoríficos de baixa capacidade e encontraram contagens de microrganismos viáveis variando entre 2,7 e 3,8 \log_{10} UFC/cm². Na Espanha, MARTÍNEZ et al. (2009) obtiveram, na maioria das carcaças amostradas por suabe, níveis de CBT entre 3,10 e 4 \log_{10} UFC/cm².

MARTÍNEZ et al. (2010) relataram, em carcaças bovinas quentes, uma população média de microrganismos viáveis de 3,91 \log_{10} UFC/cm². No Canadá, GILL & BADONI (2010), após conduzirem uma pesquisa em carcaças bovinas amostradas por pessoas com e sem experiência, relataram valores médios de microrganismos viáveis variando de 1,20 a 1,60 \log_{10} UFC/cm².

Em superfícies de contato com alimentos, EISEL et al. (1997) observaram, com frequência, valores de CBT entre 2,2 e 3,7 \log_{10} UFC/cm², com as maiores estimativas provenientes de correias da linha de fabricação. GILL et al. (1999) verificaram estimativas de CBT entre 1,57 e 5,08 \log_{10} UFC/cm², após a higienização de equipamentos. GILL & JONES (1999) obtiveram valores médios para CBT de 6,5; 7,9 e 9,2 \log_{10} UFC/luva para suabes de luvas de algodão, amostras de lavagem de luvas de algodão e amostras de lavagem de luvas de aço inoxidável, respectivamente.

GILL & McGINNIS (2000) encontraram populações de bactérias aeróbias em todas as luvas de aço inoxidáveis amostradas no Canadá, com números de \log_{10} entre 1 e 8/luva. Na África do Sul, SHALE et al. (2006) verificaram em todas as superfícies amostradas na sala de desossa, contagens de microrganismos viáveis acima de 10⁴ UFC/cm². EUSTACE et al. (2007), ao analisarem facas usadas por operadores no processo de abate, imediatamente após a higienização, detectaram valores entre 1,78 e 2,18 \log_{10} UFC/cm², para CBT em superfícies.

Com o reconhecimento de que a contagem total de aeróbios não poderia ser um indicador adequado da possível contaminação da carne por organismos patogênicos, a *E. coli* não-patogênica biotipo I foi proposta para ser adotada como organismo indicador

para efeitos do programa APPCC (GILL, 1995). A escolha da *E. coli* é justificada pela sua posição estabelecida como indicador de contaminação fecal e no pressuposto de que os patógenos associados com a carne são amplamente de origem fecal (USDA, 1996).

Schardinger foi o primeiro pesquisador que, em 1892, utilizou a *E. coli* como indicador de contaminação de origem fecal presente na água. A pesquisa de *E. coli* ou de coliformes fecais nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (LANDGRAF, 2008).

Quantidades substanciais de *E. coli* nos alimentos sugerem falta geral de limpeza, além de manejo e armazenamento inadequados, embora sua presença não constitua uma conotação direta da presença de um patógeno, mas implica unicamente em certo risco de que possa estar presente. Em outras palavras, a presença de *E. coli* nos alimentos nem sempre mantém estreita correlação com a presença de Salmonelas ou outros microrganismos patogênicos (ICMSF, 2000).

As bactérias coliformes são boas indicadoras de contaminação fecal da água. Seu uso como indicadores de qualidade higiênica de alimentos baseia-se na experiência positiva adquirida com a água. A presença de um grande número desses organismos nos alimentos e na água indica a poluição ou contaminação fecal (JAY, 1978).

O termo coliformes compreende bactérias da família *Enterobacteriaceae*, fazendo parte desse grupo predominantemente bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiela*. Destas, apenas a *E. coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais (LANDGRAF, 2008).

GILL et al. (1996a, 1996b) sugeriram que avaliações baseadas na contagem de *E. coli*, de bactérias entéricas ou de coliformes totais, sejam ferramentas das mais adequadas para avaliar os riscos de saúde associados à contaminação das carcaças bovinas. Assim, esses padrões microbianos são usados para mensurar a eficácia ou não do sistema APPCC e dos seus pré-requisitos (TERGNEY & BOLTON, 2006).

GILL et al. (1998), analisando carcaças bovinas colhidas em 10 frigoríficos do Canadá, encontraram valores médios de *E. coli* e coliformes variando entre 2 e <100 UFC/cm² e entre 3 e <100 UFC/cm², respectivamente. Em um estudo realizado por HANSSON (2001), 34% das amostras de carcaça bovina dos frigoríficos de alta capacidade e 41% dos frigoríficos de baixa capacidade apresentaram *E. coli*, já para coliformes as porcentagens encontradas foram de 50% e 42%, respectivamente.

SUMNER et al. (2003) detectaram *E. coli* em 18,8% das carcaças bovinas analisadas, com valor médio de log₁₀ de 0,34. Com o objetivo de investigar a eficácia da pasteurização em carcaças naturalmente contaminadas na Irlanda, MINIHAN et al. (2003) isolaram *E. coli* a partir da região do pescoço, região mediana e alcatra em 100%, 93% e 90%, antes da pasteurização, com contagem >2 log₁₀ UFC/100cm² nos locais mais contaminados da carcaça. Após a pasteurização os valores por região caíram para 97, 77 e 67%, respectivamente, e a contagem reduziu 2 log₁₀.

McEVOY et al. (2004) avaliaram 36 carcaças bovinas ao longo de um período de 12 meses e obtiveram para *E. coli* valores médios de 2,47 e 2,00 log₁₀ UFC/cm² para região de peito e pescoço após a lavagem das carcaças, e 1,18 e 1,95 log₁₀ UFC/cm² para essas mesmas regiões após a refrigeração das carcaças. Já, os valores obtidos para coliformes fecais após a lavagem das carcaças foram de 3,34 e 3,41 log₁₀ UFC/cm² para região de peito e pescoço, respectivamente, e de 2,85 e 2,94 log₁₀ UFC/cm² para as mesmas regiões, após a lavagem das carcaças. PHILLIPS et al. (2006) amostraram 1.155 carcaças bovinas em 27 estabelecimentos de abate na Austrália e relataram que *E. coli* esteve presente em 8% das carcaças, com uma contagem média de 0,8 log₁₀ UFC/cm².

Com o objetivo de avaliar a contaminação microbiana do couro e da superfície de carcaças bovinas provenientes de terminação a pasto e em confinamento, JARDIM et al. (2006) observaram contagens médias (log₁₀ UFC/cm²) de coliformes totais e *E. coli*: antes da esfolagem, 1,27 e 0,86; após a esfolagem, 0,40 e 0,40, e após a lavagem, 0,55 e 0,42 para os bovinos em pastagens; antes da esfolagem, 0,65 e 0,64; após a esfolagem, 0,40 e 0,40, e após a lavagem, 0,41 e 0,40 para os bovinos em confinamento. GHAFIR et al. (2008),

avaliaram os indicadores higiênicos na Bélgica e obtiveram valores médios para *E. coli* entre 0,05 log₁₀ UFC/cm² a 3,19 log₁₀ UFC/cm².

2.1.2 Análises Laboratoriais

Análises laboratoriais são indispensáveis para verificar se os padrões e especificações microbiológicas, nacionais ou internacionais, estão sendo atendidos adequadamente. Atualmente os métodos laboratoriais são comumente divididos em métodos “tradicionais ou convencionais” e métodos “rápidos”. Os métodos convencionais estão descritos em publicações consideradas de referência, internacionalmente aceitas, porém requerem grande disponibilidade de tempo e excessivo trabalho laboratorial (SILVA et al., 2006; FRANCO, 2008).

Os métodos rápidos surgiram a partir da década de 70, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos e melhorar a produtividade laboratorial. Além desses objetivos, esses métodos visam também a simplificação do trabalho e a redução de custos. Para alguns métodos, a essas vantagens aliam-se outras como maior sensibilidade e especificidade (FRANCO, 2008).

As placas Petrifilm™, desenvolvidas na década de 80, constituem em um método alternativo para enumerar microrganismos indicadores higiênicos de alimentos (BELOTI et al., 2003). O Petrifilm™ EC é reconhecido por várias organizações internacionais (AOAC e APHA) como método oficial para contagem de coliformes e *E. coli* em todos os tipos de alimentos (APHA, 1992). Alguns países como Estados Unidos, Canadá, Austrália, Coreia, Portugal, Noruega, Itália, entre outros, desenvolveram trabalhos e estudos colaborativos para avaliar a eficiência das placas Petrifilm e de outros métodos rápidos em relação aos métodos convencionais (SILVA et al., 2006).

As placas de Petrifilm são compostas por nutrientes ou agentes seletivos e diferenciais revestidos por filmes, juntamente com um agente geleificante solúvel em água fria e cloreto de trifeniltetrozólíio. Um mL da diluição é plaqueada diretamente sobre as placas, espalhadas através da pressão sobre o inóculo contra um filme

sobreposto, com auxílio de um espalhador plástico (difusor). A contagem das colônias é realizada após a incubação das placas inoculadas, nas mesmas condições que o plaqueamento convencional (SENYK et al., 1987).

2.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a indústria de alimentos que mantém os seus produtos até a obtenção dos resultados, o tempo consumido em métodos convencionais causa prejuízos econômicos, com um conseqüente e contínuo interesse em métodos alternativos, mais rápidos. As técnicas mais modernas para a detecção e caracterização de microrganismos envolvem o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) (SILVA & EIROA, 1993; FRANCHIN et al., 2006).

A técnica de PCR resulta na amplificação de segmentos específicos de DNA em bilhões de vezes, usando para isso uma polimerase termoestável (geralmente Taq, a enzima DNA-polimerase I de *Thermus aquaticus*), deoxinucleotídeos (dNTP) e dois iniciadores que delimitam a área que será amplificada, cujas sequências são complementares entre si e à sequência alvo (O'SULLIVAN, 1999).

Para iniciar uma amplificação por PCR, a enzima é adicionada ao DNA-molde anelado aos iniciadores e incubada, para que sintetize as novas fitas complementares. A mistura é então aquecida a 94°C, para desnaturar a dupla fita do DNA, resfriada a menos de 55°C, para que mais iniciadores se tornem híbridos com as sequências que lhes são complementares nas fitas simples obtidas e reaquecida a 72°C, para que a polimerase sintetize a cópia do DNA na região entre os dois iniciadores. O ciclo desnaturação-hibridização-síntese é repetido, geralmente por 25 a 30 vezes. Como cada fragmento gerado torna-se o alvo do próximo ciclo de PCR, a amplificação é exponencial e uma simples cópia pode ser potencialmente amplificada (O'SULLIVAN, 1999; BROWN, 2003).

A especificidade do método é traduzida pela utilização de sequências características dos microrganismos alvos. Os genes mais frequentemente utilizados para a detecção específica de *Salmonella* incluem: *invA* (gene da invasão proteica),

fimA (gene que codifica a maior subunidade fimbrial), *spv* (gene da virulência), *stn* (gene da enterotoxina), *fliC* (gene da flagelina) e *hilA* (gene da invasão do ativador transcricional) (CHEN et al., 2010). Genes das toxinas *stx1* e *stx2*, *rfbE* (gene que codifica o antígeno somático do sorotipo O157), *hlyA* (gene que codifica o antígeno somático do sorotipo pO157), *eaeA* (gene da intimina), *uidA* (gene da β -glicuronidase) e *fliC* (gene que codifica o antígeno flagelar do sorotipo H7) são alguns dos exemplos de sequências usadas para detecção de *E. coli* O157:H7 (YOSHITOMI et al., 2006). Ensaio de PCR que utilizam as sequências dos genes *prfA*, *prs*, *lmo*, *orf* e *flaA* são usados para a amplificação de *L. monocytogenes* (KÉROUANTON et al., 2010).

O sistema BAX® (DuPont Qualicon) é o primeiro sistema comercial para a detecção de patógenos de origem alimentar baseado na técnica de PCR. Ele simplifica o processo da PCR, por meio da combinação de todos os reagentes necessários (“primers”, enzima, deoxiribonucleotídeos) em um único “kit” (BENNETT et al., 1998).

Possui as aprovações: AOAC-RI – Official Method 2003.09 para Salmonelas em carne crua, AOAC-RI – Performance Tested Method 010401 para *E. coli* O157:H7 em carne moída, AOAC-RI – Performance Tested Method 030502 para gênero *Listeria* em meio ambiente e, no Brasil - MAPA MLG 8A.01, para *L. monocytogenes* em meio ambiente.

É um método automatizado e focado na composição genética do organismo, detectando um único fragmento de DNA do organismo alvo. Utiliza reativos disponibilizados em tabletes e um termociclador convencional. A mistura contendo a amostra de DNA, a DNA-polimerase, nucleotídeos e “primers” sofre uma série de ciclos cronometrados de aquecimento e resfriamento. À medida que o processo de amplificação ocorre, um corante liga-se à fita dupla de DNA, emitindo um sinal fluorescente em resposta à luz. Após a amplificação, o sistema BAX começa a fase de detecção, na qual o sinal fluorescente é medido. Durante a detecção, a temperatura é elevada e as cadeias de DNA se separam, liberando o corante e diminuindo o sinal emitido. Por fim, uma curva de fusão é gerada e interpretada pelo “software” do sistema BAX (TICE et al., 2009).

2.2. Principais Patógenos Monitorados no Abate de Bovinos

2.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Geralmente permanece inofensiva no lúmen intestinal, entretanto, em hospedeiros debilitados ou imunossuprimidos, ou quando a barreira imune do trato gastrintestinal é violada, mesmo linhagens não-patogênicas podem causar infecção (NATARO & KAPER, 1998).

As bactérias da espécie *E. coli* são representantes da família *Enterobacteriaceae*. São pequenos bacilos Gram-negativos, catalase-positivos, oxidase-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos. A maioria das cepas fermenta a lactose, apesar de algumas serem fermentadoras lentas e outras anaerogênicas. Comumente, a espécie é Vermelho de Metila positiva e Voges-Proskauer negativa e não se multiplica no meio citrato de Simmons, com produção de indol pela maioria das cepas (ICMSF, 1998).

Antígenos somático (O), flagelar (H) e, por vezes, capsular (K) são usados para sorotipagem de *E. coli*. Os antígenos somáticos são de natureza lipopolissacarídica, localizando-se na superfície da parede celular. A especificidade desses antígenos é determinada pelas cadeias laterais de carboidratos. Os antígenos flagelares são de natureza protéica, e os antígenos capsulares são compostos de polissacarídeos. Antígenos fimbriais (F), de natureza protéica, agem como adesinas, facilitando a aderência às superfícies mucosas (QUINN et al., 2005). Até o momento foram descritos 173 diferentes antígenos O, 56 H e 100 K (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

O significado da presença de *E. coli* em um alimento deve ser avaliado sob dois aspectos. Primeiramente, por tratar-se de uma enterobactéria, uma vez presente, indica que esse alimento tem uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições higiênicas insatisfatórias. O outro aspecto a ser considerado é que

diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e animais (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Três síndromes clínicas gerais resultam da infecção com linhagens patogênicas de *E. coli*: (i) infecções do trato urinário, (ii) sepses/meningites e (iii) doenças entéricas/diarréicas. Entre os entero-patógenos, normalmente veiculados por alimentos e água, há seis categorias bem definidas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (NATARO & KAPER, 1998).

EHEC (*Escherichia coli* entero-hemorrágica)

O reconhecimento de EHEC como uma classe distinta de *E. coli* patogênica resultou de duas principais observações epidemiológicas. A primeira foi em 1983, relatada por Riley et al, ao investigarem dois surtos de Colite Hemorrágica (CH – “HC”) provocados pela ingestão de hambúrgueres mal-cozidos em uma rede de restaurantes “fast-food”. A cultura de fezes desses pacientes revelou que alguns eram portadores de *E. coli* O157:H7, um raro sorotipo. A segunda observação foi realizada no mesmo ano por Karmali et al., ao demonstrarem a associação de casos esporádicos de Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU – “HUS”) com citotoxina e a presença de *E. coli* produtora de citotoxina nas fezes de pacientes (NATARO & KAPER, 1998).

Ainda em 1983, coube a outros pesquisadores a tarefa de demonstrar que várias amostras de *E. coli*, inclusive a O157:H7 isolada de pacientes com CH e uma outra isolada de um paciente canadense portador da SHU, tinham a capacidade de produzir uma citotoxina muito parecida com a toxina descrita por Shiga, há mais de 100 anos, em amostras de *Shigella dysenteriae*, no Japão. A convergência destes trabalhos deixou claro que existiam amostras de *E. coli* capazes de produzir uma toxina semelhante à toxina descrita por Shiga, hoje chamada toxina de Shiga, a qual poderia ser a causa da CH e da SHU. Em 1987, foi proposta a designação de EHEC para estas

bactérias, mas ultimamente vários autores têm preferido denominá-las *E. coli* produtoras de Shiga toxina ou STEC (ORDOÑEZ & TRABULSI, 2005).

Sendo a *E. coli* O157:H7 a causa primária de CH e SHU nos Estados Unidos, Canadá, Grã-Bretanha, outras regiões da Europa e provavelmente responsável por 85-95% dos casos de SHU, a classificação da EHEC, em grande parte, foi baseada nas características desse sorotipo (GRIFFIN, 1995; BUCHANAN & DOYLE, 1997). São denominados de STEC não-O157 aqueles sorotipos, distintos de O157:H7 e que produzem a Shigatoxina. Reserva-se o termo EHEC para aqueles sorotipos da categoria STEC que estão associados com a doença severa no homem, tais como O157:H7 e O26:H11, O103:H2, O111:H8/H-, O113:H21, os mais frequentes entre os não-O157 (EDUARDO et al., 2002).

O mecanismo de patogenicidade da EHEC está relacionado com a produção de citotoxinas. Essas citotoxinas são denominadas verotoxinas (VTs), uma vez que sua atividade biológica pode ser observada em culturas de células Vero, originárias de rim de macaco, ou toxinas Shiga-like (SLTs), já que são semelhantes à toxina produzida pelo bacilo de Shiga (*Shigella dysenteriae* tipo 1), causador da disenteria bacilar (FRANCO & LANDGRAF, 2008). A toxina é uma proteína composta por 70.000 Dalton de uma única subunidade A (32 KDAL) e cinco subunidades B (7,7 KDAL) (BUCHANAN & DOYLE, 1997). São conhecidos dois tipos de toxina Shiga (Stx): Stx1 e Stx2, que compartilham 55% de aminoácidos homólogos. Uma cepa de STEC pode produzir uma das toxinas (Stx1 ou Stx2), ambas (Stx1 + Stx2) ou múltiplas formas de Stx2 (EDUARDO et al., 2002; KAPER et al., 2004).

A patogênese das infecções por EHEC pode ser dividida nas seguintes etapas: sobrevivência no ambiente ácido do estômago, adesão à mucosa e colonização do cólon, produção e absorção de Stx e lesão vascular. O sistema de regulação lhe permite adaptar-se e sobreviver no ambiente ácido do estômago, possibilitando uma infecção com um número relativamente pequeno de bactérias (entre 100 e 200). Ultrapassada a barreira gástrica, as EHEC sobreviventes atingem o intestino grosso, onde aderem à mucosa, mediada pela intimina, proliferam e produzem a toxina Stx. A Stx é absorvida pela mucosa, entra na circulação e vai agir sobre as células endoteliais,

principalmente dos pequenos vasos. No cólon, deve ocorrer o rompimento de vasos e nos rins ocorre obstrução dos vasos do glomérulo, o que leva à insuficiência renal (ORDOÑEZ & TRABULSI, 2005).

Cepas de *E. coli* pertencentes a mais de 200 sorotipos podem expressar Stx (JOHNSON et al., 1996). As STEC são causas de um amplo espectro de doenças, compreendendo desde uma diarreia branda até casos severos de CH que podem evoluir para complicações extraintestinais graves, como a SHU e a Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT). O sorotipo O157:H7 é ainda o predominante entre as EHEC e o mais frequentemente associado a surtos de origem alimentar (VOLD et al., 1998; EDUARDO et al., 2002).

A CH é resultado do edema na mucosa do cólon, erosão e hemorragia. O período de incubação geralmente varia entre 1 a 2 dias, apesar de períodos mais longos (3 a 5 dias) já terem sido relatados. O início dos sintomas é marcado por uma súbita dor severa, seguida por diarreia aquosa. Náuseas e vômitos ocorrem nos estágios iniciais da doença, associados à distensão abdominal. Dentro de 1 a 2 dias a doença progride para uma diarreia sanguinolenta. A temperatura do paciente geralmente é normal, embora a febre alta possa estar presente nos idosos. A taxa de mortalidade em alguns surtos alcançou 36%, enquanto que em outros, nenhuma morte foi registrada (VARNAM, 1991; BUCHANAN & DOYLE, 1997).

Na maioria dos pacientes, a diarreia sanguinolenta não desenvolverá sequelas aparentes, mas em cerca de 10% dos doentes menores de 10 anos (e em muitos pacientes idosos) a doença progredirá para SHU. A SHU é definida por uma tríade: anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal (NATARO & KAPER, 1998). A principal manifestação clínica é a insuficiência renal que afeta a grande maioria dos pacientes, acompanhada de palidez, hematomas e petéquias. A hipertensão arterial e manifestações neurológicas como irritabilidade, letargia, convulsões, coma, apresentam-se em 25% dos afetados. Alterações em outros órgãos, como pâncreas e coração, têm sido descritas na literatura com importante frequência (EDUARDO et al., 2002).

Outra complicação associada às infecções causadas por EHEC é a PTT. Ela possui todas as características clínicas da SHU, embora a lesão renal seja geralmente menos severa. É uma síndrome caracterizada pela presença de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, sintomas neurológicos, insuficiência renal e febre, sendo restrita principalmente aos adultos (RUGGENENTI & REMUZZI, 1990; LUTZKY et al., 2004). Em idosos, a taxa de mortalidade pode ser de 50% (FDA, 2009a).

A EHEC é transmitida ao homem principalmente através do consumo de alimentos contaminados, como carne moída crua ou mal-cozida e leite cru. A contaminação fecal de água e outros alimentos, bem como a contaminação cruzada durante a preparação dos mesmos, também levam à infecção. Exemplos de alimentos implicados em surtos de *E. coli* O157:H7 incluem hambúrgueres mal cozidos, salame seco curado, suco de maçã não-pasteurizado, iogurte, queijo e leite. Frutas e hortaliças (couve, alface, repolho, salada) estão associadas a um número crescente de surtos em que a contaminação pode ser decorrente do contato das fezes de animais domésticos ou selvagens, em algum momento durante o cultivo ou manipulação. Embora a quantidade de microrganismos necessária para causar a doença não seja conhecida (dose infectante), suspeita-se que seja semelhante à da *Shigella* sp. (10 microrganismos) (CVE, 2000; WHO, 2005).

As EHEC têm constituído um sério problema de saúde pública na maioria dos países desenvolvidos, como EUA, Canadá, Japão, Reino Unido, Alemanha e outros (ORDOÑEZ & TRABULSI, 2005). Nos EUA, estima-se que a *E. coli* O157:H7 cause, anualmente, 73.000 infecções, 2.168 hospitalizações e 61 mortes (MEAD et al., 1999). No período de 1982 a 2002, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) investigou 350 surtos ocasionados por *E. coli* O157:H7 em 49 estados dos EUA, representando 8.598 casos, com 1.493 hospitalizações, 354 casos de SHU e 40 mortes (RANGEL et al., 2005).

Em 1990, um surto de gastroenterite no norte de Dakota, EUA, acometeu pelo menos 70 pessoas, das quais 16 foram hospitalizadas e 2 crianças desenvolveram SHU. Um rosbife servido em um jantar foi a fonte mais provável de infecção, e os

sintomas mais frequentes foram: diarreia (93%), cólicas abdominais (79%), diarreia sanguinolenta (39%) e náusea (30%) (CDC, 1991).

Entre novembro de 1992 e fevereiro de 1993, mais de 500 infecções com *E. coli* O157:H7 foram confirmadas em laboratório, com 4 mortes em 4 estados do noroeste dos EUA: Washington, Idaho, Califórnia e Nevada. O surto de CH e SHU foi provocado pela ingestão de hambúrgueres contaminados em uma rede de restaurantes (CDC, 1993). Em julho de 1993, 3 casos de infecção por *E. coli* O157:H7 entre residentes de uma pequena comunidade na Califórnia, EUA, foram confirmados. *E. coli* O157:H7 foi isolada a partir da carne moída que foi usada no preparo de hambúrgueres, o alimento incriminado. A diarreia sanguinolenta foi o sintoma mais comum entre os pacientes (CDC, 1994).

Um surto de *E. coli* O157:H7, em junho de 2002, entre moradores de Colorado, EUA, e em outros 6 estados, envolveu 28 pessoas que ingeriram carne moída contaminada. Sete pacientes foram hospitalizados e 5 desenvolveram SHU (CDC, 2002a). O consumo de carne moída contaminada por *E. coli* O157:H7 foi responsável por um outro surto em 8 estados dos EUA entre setembro e novembro de 2009. Vinte e seis pessoas foram acometidas, com 19 hospitalizações, 5 casos de SHU e 2 mortes (CDC, 2009a).

Na América do Sul, vários casos têm sido registrados no Chile e na Argentina, este último é considerado o país com o maior número de casos de SHU no mundo. No Brasil, foram notificados até agora pouquíssimos casos de infecção por EHEC, não se sabendo as razões. A frequência elevada da SHU na Argentina tem sido atribuída ao grande consumo de carnes, inclusive, pelas crianças (ORDOÑEZ & TRABULSI, 2005).

De 1998 a 2007, foram notificados 89 casos de SHU no Estado de São Paulo, com média de 9 casos por ano, computando 35 óbitos e taxa de letalidade de 40% (CVE, 2000). Em 2001, foram isoladas 2 cepas de *E. coli* O157:H7 de pacientes com diarreia, residentes em Campinas, SP. Um com história de ingestão de hambúrguer e outro de carne moída. Entretanto, não foi possível a comprovação laboratorial dos alimentos suspeitos, bem como, não se conseguiu estabelecer a relação entre os casos (EDUARDO et al., 2002).

Um estudo retrospectivo realizado no Estado de São Paulo a partir da base de dados AIH/DATASUS, no período de 1998 a 2000, apontou para a existência de 15 casos de SHU, sendo que 12 apresentaram história anterior de diarreia de possível associação com *E. coli* O157:H7; destes, 9 tiveram diarreia sanguinolenta e 80% dos casos eram crianças de 0 a 3 anos (EDUARDO et al., 2002).

O principal reservatório das EHEC é o trato intestinal bovino (KAPER et al., 2004), sendo suas fezes responsáveis pela contaminação de alimentos (GRIFFIN, 1995). O couro, tanto do bovino criado em confinamento quanto criado a pasto, torna-se carreador de uma mistura de bactérias fecais, incluindo *E. coli* O157:H7. No momento do abate, uma parte dessas bactérias habitantes do couro e presente nas fezes é transferida para a carcaça, contaminando a carne (ELDER et al., 2000; ARTHUR et al., 2008).

As *E. coli* produtoras de Stx são geralmente isoladas de animais saudáveis, embora possam estar associadas com um episódio inicial de diarreia em animais jovens, seguida pela colonização assintomática (NATARO & KAPER, 1998). Bovinos adultos e bezerras desmamados que carregam *E. coli* O157:H7 geralmente permanecem assintomáticos, mas eliminam as bactérias no ambiente através de suas fezes (GANSHEROFF & O'BRIEN, 2000).

A dieta e as práticas de manejo nos grandes sistemas de produção (pasto e confinamento) podem influenciar a prevalência e os números de *E. coli* e *E. coli* O157 eliminada por estes animais (FEGAN et al., 2004a). Os bovinos são muitas vezes alimentados com dietas de alta concentração de grãos para maximizar a eficiência do crescimento (HUNTINGTON, 1997). O tipo de grão utilizado na ração de acabamento pode afetar significativamente a eliminação de *E. coli* O157:H7 pelas fezes (CALLAWAY et al., 2004).

Estudos indicam que uma mudança abrupta na ingestão de uma dieta rica em grãos para uma dieta baseada em forragens, diminui a população de *E. coli* no animal, embora a magnitude do seu efeito não seja sempre consistente (CALLAWAY et al., 2003). DIEZ-GONZALEZ et al. (1998), ao submeterem os bovinos a uma mudança abrupta de ração para uma dieta com 100% de feno, obtiveram diminuições

significativas de *E. coli* e populações de *E. coli* ácido-resistentes dentro de 5 dias. KEEN et al. (1999) dividiram em dois grupos distintos bovinos naturalmente infectados com *E. coli* O157:H7: um mantido com ração de confinamento e o outro com feno. Dos bovinos alimentados com grãos, 52% mantiveram-se *E. coli* O157:H7 positivos, em comparação a 18% dos bovinos alimentados com feno. No entanto, BAALÉ et al. (2004) observaram que bovinos submetidos a dietas ricas em feno, apresentaram culturas positivas de *E. coli* O157:H7 por um período mais prolongado, além de um maior número desses microrganismos, quando comparado a bovinos alimentados com dietas ricas em grãos. HOVDE et al. (1999) obtiveram resultado semelhante, embora a *E. coli* O157:H7 tenha sido inoculada experimentalmente.

Em relação aos sistemas de produção, DONKERSGOED et al. (1997) afirmaram que os couros dos animais mantidos em regime intensivo estão mais susceptíveis a acumular grandes quantidades de material fecal e, conseqüentemente, maior número de organismos fecais, em virtude da grande aproximação dos bovinos, quando comparados ao regime extensivo. Entretanto, bovinos em pastagens, como no Brasil, podem estar em contato com ambientes contendo fezes, efluentes de esgoto, alimentos e água contaminados (GENIGEORGIS, 1987).

Durante uma investigação em um matadouro no sul de Yorkshire, CHAPMAN et al. (1993) isolaram *E. coli* O157 em 4% (84) das amostras de suabe retal bovino, das quais 93% eram VT+ e em 30% (7) das amostras de suabe de carcaça daqueles bovinos anteriormente positivos para o suabe retal. CHAPMAN et al. (1997) isolaram *E. coli* O157 em 246 (13±4%) amostras de fezes de 1.840 bovinos de corte e em 268 (16±1%) amostras de fezes de 1.661 bovinos leiteiros, logo após o abate. Desses, 86±3% dos isolamentos foram do sorotipo *E. coli* O157:H7. Em Lugo, na Espanha, a taxa de prevalência de VTEC para vacas e bezerros assintomáticos foi de 35 e 37%, respectivamente (BLANCO et al., 1997).

Em um frigorífico no norte da Itália foi encontrada VTEC O157 em 16,6% dos bovinos confinados e em 16,1% das vacas leiteiras, sendo a taxa de isolamento maior durante o verão (17,5%), comparado ao inverno (2,9%) (BONARDI et al., 1999). No oeste dos EUA, 28% (91 das 327) e 11% (38 das 355) das amostras de fezes e de

couro foram positivas para EHEC O157, respectivamente. Para as amostras de carcaças, 17% foram positivas para EHEC O157 no pós-processamento, antes da refrigeração (ELDER et al., 2000). No Japão, a prevalência de STEC O157 nas fezes de bovinos naturalmente infectados foi de 3,5%, com concentração nas fezes (10g) variando de 4 a >110.000 UFC (WIDIASIH et al., 2003).

Em 2002, OMISAKIN et al. (2003) encontraram uma taxa de prevalência de 7,5% em amostras de fezes colhidas do reto de bovinos abatidos. Dos 44 animais infectados, 9% eram “supershedders”, eliminando *E. coli* O157 em concentrações de $>10^4$ UFC.g⁻¹. A partir dos resultados, os autores concluíram que a presença de animais “supershedders” no frigorífico aumenta o risco potencial de contaminação da carne durante o processo de abate. McEVOY et al. (2003b) identificaram *E. coli* O157:H7 em 2,4% das amostras fecais e 3,2% das amostras de carcaça em um frigorífico comercial da Irlanda. De acordo com MEICHTRI et al. (2004), na Argentina, 0,5% das carcaças de novilhos criados em confinamento apresentaram *E. coli* O157:H7 na área do abate.

FEGAN et al. (2004a) relataram, na Austrália, uma prevalência de 13% para *E. coli* O157 isolada nas fezes, não havendo diferença entre bovinos a pasto (10%) e bovinos confinados (15%). Um estudo realizado nos Estados de Colorado, Nebraska e Montana, nos EUA, detectaram 24,7% (111/450) de amostras fecais positivas para *E. coli* O157 em bovinos confinados. Treze (86,7%) dos 15 currais apresentaram pelo menos uma amostra positiva para *E. coli* O157 (DEWELL et al., 2005). Ainda nos EUA, em estudo realizado por ARTHUR et al. (2008), mostrou que a prevalência de *E. coli* O157:H7 no couro de bovinos confinados foi de 66% e nas fezes de 24,5%.

FOX et al. (2008) isolaram *E. coli* O157 em 2,6% das amostras de carcaça bovina na pré-evisceração e em 30% dos caminhões de transporte. Na Argentina, das 1.622 carcaças bovinas quentes amostradas em frigoríficos habilitados à exportação por MASANA et al. (2010), 2,6% apresentaram STEC O157.

No Brasil, CERQUEIRA et al. (1999) detectaram uma alta ocorrência (71%) de Stx em fezes de bovinos saudáveis no Estado do Rio de Janeiro-RJ, sendo mais frequente entre os bovinos leiteiros (82%) do que os bovinos de corte (53%). VICENTE (2006) observou uma alta prevalência (72,16%) de sequências Stx nas fezes de

bovinos leiteiros de Jaboticabal-SP, onde 60% dos rebanhos apresentaram *E. coli* O157 em suas fezes.

IRINO et al. (2005) ao analisarem amostras fecais de bovinos leiteiros em São Paulo-SP, encontraram taxas de isolamentos de STEC variando de 3,8% a 84,6%, dependendo da fazenda estudada, e 25,5% de animais colonizados com STEC. RIGOBELLO et al. (2006) estudaram carcaças de bovinos confinados no Estado de São Paulo e encontraram apenas uma amostra apresentando STEC, entre 80 analisadas. De acordo com TRISTÃO et al. (2007), 28% e 65% das fezes de bovinos saudáveis apresentaram STEC, no Estado do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, respectivamente, sugerindo que o bovino saudável pode ser uma fonte potencial de infecção para os humanos.

Em recortes cárneos a incidência de *E. coli* O157:H7 é frequentemente baixa. Nos Estados Unidos, KENEDDY et al. (2006) não a isolaram de nenhuma das 1.199 amostras de recortes bovinos analisadas. STOPFORTH et al. (2006) observaram em média, 0,3% das amostras de cortes de carne bovina *in natura* contaminadas por *E. coli* O157:H7, todos derivados da área do lombo.

2.2.2 *Listeria* sp.

A listeriose de origem alimentar é uma doença relativamente rara, mas grave, com altos índices de mortalidade (20% a 30%) em comparação a outros patógenos transmitidos por alimentos, como as Salmonelas. A doença, em grande parte, afeta segmentos específicos da população que têm maior susceptibilidade, sendo observada principalmente em países industrializados (WHO/FAO, 2004).

O gênero *Listeria* compreende bacilos pequenos, regulares, que podem se apresentar em unidades ou em cadeias pequenas. Suas células são Gram-positivas, não esporogênicas, não capsuladas, móveis a 20-25°C e anaeróbias facultativas. São catalase-positivas e oxidase-negativas, com temperatura ótima de multiplicação entre 30 e 37°C (HOLT et al., 1994). As Listerias estão amplamente distribuídas no meio ambiente e podem ser recuperadas de pastagens, solo, alimentos, fezes humanas e de

animais, efluente de esgoto e corpos de água (VÁZQUEZ-SALINAS et al., 2001; QUINN et al., 2005).

São reconhecidas oito espécies de *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. denitrificans*, *L. murrayi* e *L. grayi*, no entanto constantes alterações taxonômicas vem sendo realizadas (FRANCO & LANGRAF, 2008). As espécies *L. innocua*, *L. murrayi* e *L. grayi* são consideradas não patogênicas; *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* raramente causam infecção humana, reservando à *L. monocytogenes* o papel de espécie mais importante (ICMSF, 1998).

A *L. monocytogenes* pode se multiplicar dentro de uma grande variedade de temperaturas, que vai de 2,5 a 45°C, conquanto existam relatos de multiplicação a 0°C. Suporta repetidos congelamentos e descongelamentos. Embora o pH ótimo para a multiplicação desta bactéria esteja entre 6 e 8, ela pode tolerar valores entre 5,5 e 9,6. A atividade de água ótima para sua multiplicação é próxima a 0,97, além de ser considerada relativamente tolerante ao NaCl. Na indústria da carne, este microrganismo pode ser problema, uma vez que sobrevive aos níveis recomendados de nitrato de sódio e de cloreto de sódio (120mg/kg de NaNO₃ e 3% de NaCl) (VARNAM, 1991; QUINN et al., 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Embora seja um organismo comum na natureza, é considerada uma importante causa de zoonoses. Tanto o homem, os animais e o ambiente servem como reservatórios desta bactéria. É patogênica para uma extensa variedade de animais e também pode ser encontrada no trato intestinal de animais saudáveis e com infecções subclínicas, sendo eliminada pelas suas fezes (VARNAM, 1991; GRACEY & COLLINS, 1992). Tem sido relatada em pelo menos 37 espécies de mamíferos (domésticos e selvagens), 17 espécies de pássaros e possivelmente em algumas espécies de peixes e crustáceos. Alguns estudos sugerem que de 1% a 10% da população humana seja portadora intestinal deste patógeno (FDA, 2009b).

As fontes de infecção de origem alimentar em bovinos de corte não são bem conhecidas. Vários estudos ao redor do mundo atribuíram à infecção, em bovinos, para o sistema de manejo, incluindo as práticas nutricionais (MOHAMMED et al., 2010). O alimento fornecido aos animais foi reconhecido como uma fonte de *L. monocytogenes*

em infecções entre animais de fazenda, especialmente ruminantes. Embora a silagem tenha sido identificada como uma importante fonte deste microrganismo, parece provável que a infecção pode também ser adquirida durante o pastejo, especialmente quando é permitido que os animais se alimentem na vegetação natural (VARNAM, 1991).

No Japão, a *L. monocytogenes* foi encontrada em 1,9% das amostras fecais de bovinos (IIDA et al., 1991). Em amostras de fezes bovinas colhidas em abatedouros locais na província de Elazig, Turquia, a prevalência de *L. monocytogenes* foi de 1,53%. Os resultados indicaram que as fezes desses animais podem ser uma fonte de contaminação das carcaças, podendo transmitir a Listeriose (KALENDER, 2003). Na Califórnia, a *L. monocytogenes* foi isolada de 3,1% das amostras fecais de vacas e 3,75% de bezerros, nas operações de abate (MOHAMMED et al., 2010).

Nas plantas de elaboração de alimentos, as superfícies úmidas albergam Listerias e isso, unido à capacidade de multiplicação a temperaturas baixas, possibilita encontrá-las em frigoríficos e unidades de refrigeração (ICMSF, 1998). Pisos e ralos são considerados fontes primárias de *L. monocytogenes* nas plantas de processamento, todavia pode ser encontrada em vários equipamentos e ambientes como vedações, correias transportadoras, máquinas de fatiar, cortar e embalar, contentores, facas, mesas e paredes; muitos pela dificuldade na higienização dessas partes ou equipamentos (VARNAM, 1991; MØRETRØ & LANGSRUD, 2004).

SAMELIS & METAXOPOULOS (1999) isolaram *Listeria* spp. em 14,3% dos equipamentos amostrados, sendo que em 68,8% deles foi observada a presença de *L. monocytogenes*. Em 6,5% das amostras de superfícies de ambiente e equipamentos, pesquisadas na Itália por PECCIO et al. (2003), havia *L. monocytogenes*.

A *L. monocytogenes* entra nas plantas industriais por meio da terra existente nos sapatos e roupas dos trabalhadores, da equipe de transporte de alimentos crus de origem animal e possivelmente por meio dos portadores humanos sãos. As fezes e couro dos bovinos também têm sido identificados como fontes de *Listeria*, incluindo *L. monocytogenes*. Uma vez instalada no local, é capaz de aderir a vários tipos de superfície (que incluem o aço inoxidável, vidro e borracha). Sobrevive nos dedos dos

operários após a lavagem das mãos e nos aerossóis (MARZOCCA et al., 2004; PRENDERGAST et al., 2007).

Um importante aspecto a ser considerado nas indústrias de alimentos é o fato de existirem cepas de *L. monocytogenes* persistentes, as quais são capazes de permanecer meses, ou até anos, no ambiente de processamento, podendo assim provocar contaminações recorrentes no produto final (MARKKULA et al., 2005). A dificuldade em eliminar esse microrganismo das indústrias é potencializada pelas condições de umidade, temperatura e presença de matéria orgânica, que aliadas à habilidade do patógeno em produzir biofilmes, podem desencadear a colonização de superfícies de equipamentos e utensílios (UHITIL et al., 2004). Contudo, tais biofilmes podem agir como um reservatório para a contaminação de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos (MØRETRØ & LANGSRUD, 2004).

Entre 1998 e 1999, GUDBJÖRNSDÓTTIR et al. (2004) realizaram uma pesquisa em 6 plantas de processamento de carnes nos países nórdicos. A incidência de *Listeria* nessas plantas foi de 13,3%, sendo 4,8% correspondente à *L. monocytogenes*. Nas amostras de carne bovina, a incidência média de *L. monocytogenes* foi de 15,6%. Na Argentina, MARZOCCA et al. (2004) detectaram *L. monocytogenes* em 5% das amostras de carne picada servida fria e embalada a vácuo, em 5% das amostras colhidas no setor de embalagens, de 6,7% nas linhas de processamento de carne e em 1,5% nos locais de venda personalizada.

No Brasil, BARROS et al. (2007), ao colherem amostras em 11 estabelecimentos varejistas de carnes localizados na região de Londrina-PR, encontraram *Listeria* spp. em 76 amostras de equipamentos, 23 de ambientes e 68 de produtos cárneos. Em Niterói-RJ, MANTILLA et al. (2007) analisaram amostras de carne bovina moída resfriada, previamente embalada, provenientes de estabelecimentos comerciais. Cinquenta por cento das amostras analisadas apresentaram contaminação por *Listeria* spp., sendo 6,7% positivas para *L. monocytogenes*.

A *L. monocytogenes* é um contaminante frequente de alimentos, sendo esta sua principal via de transmissão (GARCÍA-ÁLVAREZ & CHAVES, 2007). Estudos relatam o isolamento dessa bactéria em carne e produtos cárneos, leite cru e supostamente

pasteurizado, queijos (particularmente as variedades de maturação suave), sorvete, água, patês de carne, molhos de carne crua fermentada, salsicha, sanduíches, alimentos prontos para o consumo, arroz frito, saladas, verduras e hortaliças e alimentos de origem marinha, inclusive alimentos refrigerados e, ainda, manipuladores de alimentos. Magarefes de matadouros têm sido reportados como portadores assintomáticos (LOW & DONACHIE, 1997; ICMSF, 2000; BARRETO, 2001; CVE, 2003; FDA, 2009b).

Embora a *L. monocytogenes* e outras espécies de Listerias tenham sido isoladas de muitos tipos diferentes de alimentos crus e processados, as principais fontes e rotas de contaminação ainda não são totalmente compreendidas (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004).

Estudo realizado por COILLIE et al. (2004), na Bélgica, *L. monocytogenes* foi isolada em 23,9% das amostras de peixes, 14,3% das amostras de carne e em 40,5% das amostras de queijo. Trabalho desenvolvido em Portugal, por MENA et al. (2004), detectou 3 (17,7%) amostras de carne bovina crua positivas para *L. monocytogenes*.

VITAS et al. (2004), ao realizarem uma pesquisa em amostras de alimentos obtidas de diferentes indústrias e mercados do norte da Espanha, encontraram 34,9% de amostras de carne bovina e suína cruas positivas para *L. monocytogenes*. Entre 2006 e 2007, das 2.168 amostras de carne fatiada colhidas no Reino Unido, 3,7% foram positivas para *L. monocytogenes* dentro do prazo de validade, e 4,2% no final do prazo de validade (LITTLE et al., 2009).

Em adultos imunocompetentes a infecção por *L. monocytogenes* geralmente apresenta-se assintomática. No entanto, é mais frequente a sua atuação como patógeno quando as condições de acolhimento são favoráveis para isso, como é o caso de gestantes e fetos, com infecções neonatal e perinatal; pessoas imunossuprimidas devido à utilização de medicamentos como corticosteróides, drogas para câncer, para transplantados; pacientes com leucemia, câncer e AIDS; diabéticos, cirróticos, asmáticos e os com colite ulcerativa; idosos e pessoas normais fazendo uso de antiácidos ou cimetidina (CVE, 2003; GARCÍA-ÁLVAREZ & CHAVES, 2007).

Listeriose é a denominação de um grupo geral de desordens causadas pela *L. monocytogenes*. As manifestações da doença incluem septicemia, meningite (ou meningoencefalite), encefalite, infecção cervical ou intra-uterina em gestantes, as quais podem provocar aborto espontâneo (2º. ou 3º. trimestre) ou natimortos. O início dessas desordens é comumente precedido por sintomas semelhantes ao da gripe, com febre persistente. Sintomas gastrintestinais, como náusea, vômito e diarreia podem preceder ou acompanhar as formais mais graves da Listeriose. Outros danos como endocardite, lesões granulomatosas no fígado e outros órgãos, abscessos internos ou externos e lesão cutânea papular ou pustular também podem estar presentes (CVE, 2003; FDA, 2009b).

O período de incubação é variável. Casos de surtos apresentaram um período de 3 a 70 dias após uma simples exposição ao produto implicado, mas a média é estimada em 3 semanas. A dose infectante da *L. monocytogenes* é desconhecida, mas acredita-se variar conforme a cepa e a susceptibilidade da vítima. Em casos contraídos através de leite pasteurizado ou cru, por pessoas suscetíveis, menos de 1.000 organismos podem causar a doença. No Brasil, é subdiagnosticada e subnotificada (CVE, 2003).

Segundo o CDC (2008b) estima-se que, nos EUA, 2.500 pessoas adoecem seriamente por Listeriose a cada ano e, destas, 500 vêm a óbito. Embora os surtos causados por *L. monocytogenes* tenham sido associados com a ingestão de vários tipos de alimentos contaminados, a maioria dos casos de Listeriose nos EUA ocorre de forma isolada ou esporádica (CDC, 1992). O consumo de produtos prontos para o consumo tem sido ligado principalmente a surtos, pois são produtos consumidos sem o prévio tratamento térmico (TOMPKIN, 2002).

Em 1988, uma mulher com câncer foi hospitalizada em Oklahoma, EUA, com sepse causada por *L. monocytogenes*. O mesmo microrganismo foi isolado de um pacote aberto de salsichas de peru do refrigerador da paciente e de dois pacotes fechados do mesmo produto em uma loja local (CDC, 1989). Em 1998, 40 casos e 4 mortes, provocados pelo mesmo sorotipo de *L. monocytogenes* (4b) isolados de salsichas para cachorro quente foram identificados em 10 estados dos EUA (CDC, 1998).

Em 2000, um surto envolvendo 29 pessoas foi relatado em 10 estados dos EUA. A Listeriose causada pela ingestão de carne de peru pronta para o consumo provocou 4 mortes (CDC, 2000). Em 2002, outro surto envolvendo o mesmo alimento foi descrito em 8 estados dos EUA. Foram confirmados 46 casos, 7 óbitos e 3 natimortos ou abortos (CDC, 2002c).

Um surto de *L. monocytogenes* envolvendo o consumo de carne de peru foi relatado, em 2002, em nove estados dos EUA. Cento e oitenta e oito pessoas foram atingidas; entre elas gestantes, neonatos, indivíduos imunocomprometidos e idosos (GOTTLIEB et al., 2006). Em 2007, 122 casos de Listeriose e taxa de incidência de 0,27 por 100.000 habitantes foram descritos nos EUA (CDC, 2008a).

2.2.3 *Salmonella* sp.

A Salmonelose é uma das doenças transmitidas por alimentos mais frequentemente relatadas ao redor do mundo. A cada ano, estima-se que 1,4 milhões de pessoas, nos EUA, desenvolvam a doença, com aproximadamente 14.800 hospitalizações e 415 mortes (CDC, 2005). Em 2008, dos 18.499 casos de infecção confirmados laboratorialmente em dez Estados dos EUA, 7.444 foram causados por Salmonelas (CDC, 2009b). Os gastos com a Salmonelose de origem alimentar, para a população norte-americana, chegam a US\$ 2.329.000 anualmente, entre cuidados médicos e perda de produtividade (WHO/FAO, 2002).

No Brasil, entre os anos de 1999 e 2008, a *Salmonella* spp. foi o agente etiológico mais frequentemente envolvido em surtos de doenças transmitidas por alimentos, correspondendo a 42,9% (1.275) dos surtos registrados (BRASIL, 2008). A *Salmonella* Enteritidis tem sido o sorotipo mais comumente isolado de casos de infecções humanas e também de materiais de origem não humana, principalmente de alimentos (CVE, 2010).

Budd foi o primeiro pesquisador a deduzir que a febre tifóide era transmitida pela água e pelos alimentos. *Salmonella* Typhi, o agente etiológico da enfermidade, foi descoberto em 1880 por Erberth e isolado em 1884 por Graffy. Smith e Salmon, em

1885, realizaram os primeiros isolamentos de *Salmonella* na área de microbiologia veterinária, quando identificaram um bacilo de suínos jovens com distúrbios intestinais, denominado *Bacillus cholerasuis*. Somente em 1890, em homenagem ao seu descobridor, Dr. Salmon, o agente recebeu a denominação de *Salmonella*. O primeiro surto de Salmonelose transmitida por alimentos confirmado em laboratório envolveu 57 pessoas que ingeriram carne de uma vaca doente. Foi isolada *S. Enteritidis* dos órgãos de uma vítima que não havia sobrevivido, da carne e do sangue do animal. Desde então, as Salmonelas têm sido identificadas como a causa mais importante de febre entérica e de gastroenterites (ZWADYC, 1980; ICMSF, 1998).

O gênero *Salmonella* é um membro típico da família *Enterobacteriaceae*, formado por bacilos Gram-negativos não formadores de esporos, de superfície lisa, oxidase-negativos e catalase-positivos. A célula bacteriana mede 0,7-15µm de largura por 2-5µm de comprimento. São anaeróbios facultativos, geralmente móveis por flagelos peritríquios, produzem gás a partir da glicose (exceto *S. Typhi*) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. São redutores de nitrato, indol negativos, Voges-Proskauer negativos, vermelho de metila positivos, citrato de Simmons positivos, lisina e ornitina descarboxilase positivos. Produzem H₂S, não hidrolisam uréia, desenvolvem-se na presença de KCN e fermentam manitol (VARNAM, 1991; HOLT et al., 1994; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Segundo GRIMONT & WEILL (2007) são descritos 2.579 sorovares de *Salmonella*, desses 1.531 pertencem à espécie *enterica subsp. enterica* e somente 22 à *S. bongori*. A sorotipagem é baseada no esquema de Kaufmann e White, no qual os antígenos somáticos (O), de natureza lipolissacarídica, e flagelares (H), de natureza protéica, são identificados; ocasionalmente antígenos capsulares (Vi) podem ser detectados. Em uma modificação desse esquema, duas espécies são propostas: *S. enterica* e *S. bongori*. A *Salmonella enterica* tem sido dividida em 6 subespécies, as quais são designadas por nomes ou números romanos. A maioria das Salmonelas de importância veterinária pertence à *S. enterica subsp. enterica*. As subespécies são adicionalmente qualificadas pelo tipo, tendo uma designação final - por exemplo, *S. enterica subsp. enterica* sorotipo Typhimurium (QUINN et al., 2005; CDC, 2007).

O pH ótimo para a multiplicação das Salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. Dependendo da natureza do ácido utilizado para a acidificação, o pH mínimo pode subir para 5,5. As Salmonelas não toleram concentrações de sal superiores a 9%. O nitrito é inibitório e seu efeito é acentuado pelo pH ácido. A temperatura ideal para a multiplicação é de 35-37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima 47°C. Vários estudos indicam, no entanto, que valores máximo e mínimo dependem do sorotipo. A atividade de água afeta grandemente o desenvolvimento das Salmonelas, sendo o limite inferior de 0,94 (ICMSF, 1998; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria entérica responsável por enfermidades no homem e nos animais. Está relacionada a graves intoxicações alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países (VARNAM, 1991; SHINOHARA et al., 2008). Dependendo do sorotipo e hospedeiro, pode causar desde uma gastroenterite até febre tifóide, geralmente adquirida pela ingestão de alimento ou água contaminados (MARCUS et al., 2000).

A carne bovina crua é frequentemente contaminada por Salmonelas. A incidência varia de acordo com a espécie, práticas agrícolas e padrões higiênicos durante o abate e manipulação do alimento. Dificilmente as Salmonelas são encontradas na carne de animais domésticos que padecem de septicemia induzida por *Salmonella*, contudo é comum que esses microorganismos venham à superfície da carne a partir do conteúdo intestinal e das fezes que se aderem ao pêlo, pele e patas dos animais quando estes são levados para o abate. As infecções são raramente adquiridas diretamente através de carnes cruas. Na maioria dos surtos, a carne foi mal cozida ou contaminada após o cozimento pelas mãos de manipuladores de alimentos e pela adição de ingredientes contaminados (VARNAM, 1991; ICMSF, 1998).

No Reino Unido, LITTLE et al. (2008), ao analisarem a taxa de contaminação de amostras de carnes vermelhas por *Salmonella*, entre os anos de 2003 e 2005, encontraram 1,1% de amostras positivas para carne bovina. Em 2008, foram analisadas 2.301 amostras de bovinos abatidos em estabelecimentos dos EUA, com 0,5% de

amostras positivas e 2,4% de positividade para carne bovina moída, dentre 16.763 amostras estudadas (USDA, 2009).

Em 12 propriedades de diferentes regiões do Estado de São Paulo, LANGONI et al. (2004) identificaram a presença de *S. Typhimurium* e *S. Dublin* em 6,1 e 5,4% das amostras fecais de bezerros. Em Ribeirão Preto-SP, DRUBI (2005) não detectou *Salmonella* sp. na carne bovina moída analisada. Em Barretos-SP, FONTOURA (2006), ao avaliar meias carcaças bovinas logo após a lavagem, não encontrou bactérias do gênero *Salmonella*.

Segundo STOLLE (1981) a lama dos cascos e o couro bovino são fontes importantes de *Salmonella* e a sua incidência na linha de abate é proveniente dos animais que por ali passaram. A bactéria foi identificada por estes autores em 0,75% das amostras de fezes colhidas em um frigorífico de Berlim, Alemanha. Em outro estudo neste mesmo frigorífico, 4,3% dos suabes de ferramentas e áreas da carcaça onde tocavam mostraram-se positivos.

ROELS et al. (1997) investigaram a ocorrência de um surto envolvendo 107 casos confirmados e 51 casos prováveis em Wisconsin, EUA, causado por *S. Typhimurium* e associado ao consumo de carne bovina moída. Dentre os sintomas mais comuns estavam: diarreia (99%), dor abdominal (88%) e calafrio (75%). A compra de carne previamente contaminada ou da sua contaminação por manipuladores de alimentos foi a provável origem da contaminação.

LA PEÑA et al. (2001) determinaram que a torta de carne foi o fator de risco mais importante na ocorrência de um surto de *S. Enteritidis* entre 155 funcionários de um hospital na Cidade do México, em 1998. Segundo os autores é muito provável que os ingredientes utilizados (ovo, batata cozida e carne desfiada) vieram contaminados desde sua compra ou se contaminaram durante o preparo.

Entre janeiro e abril de 2002, o sorotipo *S. Newport* foi isolado de 47 pessoas em cinco Estados dos EUA. A carne moída crua ou mal cozida foi detectada como veículo de transmissão, através de um estudo caso-controle. Predominaram os sintomas de diarreia (100%), dor abdominal (91%), febre (78%), fezes sanguinolentas (52%) e vômito (48%), com 17 hospitalizações e 1 morte (CDC, 2002b).

Em 2003 ocorreu o primeiro surto envolvendo *S. Typhimurium* DT104 nos EUA, sendo associado ao consumo de carne moída na forma de hambúrgueres caseiros ou carne crua. Foram identificados 58 pacientes e, dos 27 entrevistados para o estudo, 41% foram hospitalizados. Os sintomas incluíram diarreia, cólica abdominal, febre e vômito (DECHET et al., 2006).

Um surto de *S. Typhimurium* envolvendo 31 pessoas foi investigado por departamentos de saúde de 6 Estados e um distrito dos EUA em 2004. A carne moída contaminada foi a principal suspeita. Sintomas como diarreia (100%), dor abdominal (92%), febre (92%), vômito (65%) e diarreia sanguinolenta (46%) foram relatados pelos pacientes. A duração média da doença foi de 7,5 dias, com 35% dos pacientes hospitalizados (CDC, 2006).

Entre 2003 e 2006, 307 isolamentos de *S. Typhimurium* DT104 e 16 de DT104b foram obtidos a partir de pessoas com doença clínica na Dinamarca. Quarenta dos 307 isolamentos foram relacionados a um surto causado por carne crua, servido como carpaccio em um restaurante (NIELSEN et al., 2009).

A estratégia de virulência comum às espécies de *Salmonella* é a invasão da mucosa intestinal e multiplicação em tecido linfóide associado ao intestino ("GAKT"). Dos tecidos intestinais infectados, os patógenos são drenados para os linfonodos regionais, onde macrófagos da linha de seios linfáticos formam a primeira barreira efetiva contra a propagação. Se o mecanismo de defesa do hospedeiro limitar a expansão bacteriana com sucesso a infecção pode permanecer no intestino e no "GAKT". Por outro lado, se os macrófagos localizados nos linfonodos forem incapazes de evitar sua propagação, a *Salmonella* pode causar uma doença sistêmica (BÄUMLER et al., 2000).

Antigamente acreditava-se que para que um indivíduo adquirisse uma Salmonelose de origem alimentar era necessária a ingestão de um número elevado ($>10^8$) de células viáveis de *Salmonella* no alimento. Vários estudos, no entanto, têm demonstrado que diversos fatores podem alterar esse valor. O estabelecimento dos sintomas, bem como a sua gravidade, depende do sorotipo envolvido, da competência dos sistemas de defesa inespecíficos e específicos do indivíduo afetado e das

características do alimento envolvido. Assim, em alimentos com elevado teor lipídico, doses infectantes de até 50 células por grama podem ser desencadeadoras de doença (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

As doenças causadas por *Salmonella* costumam ser subdivididas em três grupos: a febre tifóide, causada pela *S. Typhi*, as febres entéricas, causadas por *S. Paratyphi* (A, B e C) e as enterocolites (ou Salmoneloses), causadas pelas demais Salmonelas (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A febre tifóide é uma infecção sistêmica causada por um patógeno adaptado e restrito ao hospedeiro humano, transmitido pela ingestão de alimentos ou água contaminados por material fecal ou urina. As manifestações clínicas e severidade variam de acordo com a população, a maioria crianças ou adultos jovens entre 5 e 25 anos de idade. Após a ingestão da *S. Typhi*, um período assintomático segue normalmente por 7 a 14 dias. O início da bacteremia é marcado por febre e mal-estar. No final da primeira semana após o início dos sintomas, os pacientes geralmente apresentam febre, sintomas como os da gripe, com calafrios, cefaléia, prostração, anorexia, náusea, desconforto abdominal mal localizado, tosse seca, mialgia e poucos sinais ao exame físico. Língua saburrosa, abdômen sensível à palpação, hepatomegalia e esplenomegalia são comuns. Os adultos frequentemente têm constipação, mas em crianças pequenas e adultos com HIV a diarreia é mais comum. A febre eleva-se progressivamente e, ao final da segunda semana, torna-se frequentemente alta (39 a 40°C) e mantida. O exantema macular (“rose spots”) é relatado em 5% a 30% dos casos, que são visualizadas com mais frequência no abdômen e tórax e raramente nas costas, braços e pernas (HOUSE et al., 2001; PARRY et al., 2002).

As febres entéricas são bastante semelhantes à febre tifóide, mas os sintomas clínicos são mais brandos. Geralmente ocorrem septicemia, febre, vômitos e diarreia. Enquanto a febre tifóide pode durar de 1 a 8 semanas, as febres entéricas duram, no máximo, 3 semanas (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

As Salmoneloses caracterizam-se por sintomas que incluem diarreia, febre, dor abdominal ou cólicas, vômito, cefaléia e náusea. O período de incubação varia de 8 a 72 horas. Os sintomas podem persistir por até uma semana. As infecções variam de

moderada à severa, sendo ocasionalmente fatais em populações susceptíveis, como crianças, idosos e imunocomprometidos. Uma pequena proporção de indivíduos infectados pode desenvolver a síndrome de Reiter, uma doença artrítica caracterizada por dor, irritação ocular e dificuldade para urinar (WHO/FAO, 2002).

Portadores de Salmonelas, decorrente da infecção com sorovares adaptados a humanos, é um fenômeno comum e a excreção assintomática pode perdurar por semanas, meses ou anos. Geralmente a excreção é feita pelas fezes, embora a excreção urinária também possa ocorrer. Parece provável que a maioria dos portadores, entre os manipuladores de alimentos, é na verdade convalescente ou sofreu ativamente com a doença (VARNAM, 1991).

O habitat primário da *Salmonella* é o trato intestinal de animais como pássaros, répteis, domésticos, homem e ocasionalmente insetos (JAY, 1978). Alguns alimentos, especialmente os de origem animal como carnes cruas, ovos, aves, leite e produtos lácteos, peixe, camarão, pernas de rã e aqueles que estão expostos à contaminação por águas residuais, têm sido identificados como veículos para a transmissão aos seres humanos, disseminando para os ambientes de elaboração de alimentos e cozinhas. Fermento, côco, molhos e saladas, misturas para bolos, cremes de doces e coberturas, gelatina, manteiga de amendoim, cacau e chocolate também estão associados às Salmonelas (ICMSF, 1998; FDA, 2009c).

As Salmonelas são eliminadas principalmente pelas fezes, podendo ser transmitidas por insetos e outros seres vivos a diversos lugares. Quando água e alimentos contaminados são consumidos pelo homem e outros animais, esses organismos são novamente eliminados com as fezes, perpetuando outra vez o ciclo. Entre os animais, a contaminação se dissemina durante o transporte, a permanência em locais fechados e durante o sacrifício (ICMSF, 1998).

As práticas de criação animal, sistemas de reprodução animal, produção centralizada de alimentos e ração e o comércio internacional de alimentos contribuem para criar ciclos de perpetuação do patógeno entre o homem e os animais. Os principais elos das redes de circulação são animais-ração-animais, animais-alimentos-homem e homem-alimentos-homem (ICMSF, 2000).

Mudanças na dieta podem influenciar na eliminação fecal de bactérias patogênicas em ruminantes (CALLAWAY et al., 2003; LOOPER et al., 2006). FITZGERALD et al. (2003) relataram que o estresse comum à produção animal influencia na eliminação de *Salmonelas* em rebanhos leiteiros. Ruminantes que são alimentados seguindo as exigências de manutenção geralmente têm reduzido as concentrações de ácidos graxos voláteis e aumentado o pH no rumem, podendo resultar em aumento da prevalência de *Salmonelas* nas fezes (BROWNLIE & GRAU, 1967).

Segundo LOOPER et al. (2009) o tipo de forragem fornecida aos animais não influenciou na prevalência de *Salmonelas* em fezes de vacas de corte. Trabalho semelhante foi realizado em bovinos de corte, analisando a influência dos mesmos tipos de dieta sobre a prevalência de *Salmonella* (LOOPER et al., 2006). Os autores também relataram que a eliminação fecal de *Salmonelas* não foi afetada pelos diferentes tratamentos de forragens.

As *Salmonelas* podem permanecer por períodos consideráveis nas fezes e no pasto. Elas podem permanecer vivas na terra úmida por um ano e na terra seca por 16 meses, e não são destruídas nas carcaças ou miúdos mantidos em temperaturas de refrigeração ou congelamento (GRACEY & COLLINS, 1992).

As *Salmonelas* têm sido extensamente relatadas em bovinos. Eles podem carrear este organismo não detectado para dentro dos frigoríficos no momento do abate. Sua presença em bovinos no abate e a conseqüente contaminação cruzada da carcaça apresenta um significativo perigo de segurança alimentar (MCEVOY et al., 2003a). *S. Typhimurium* e *S. Dublin* parecem ser os sorovares mais comuns isolados de bovinos, embora a distribuição destes dois sorovares possa diferir entre países, e a *S. Dublin* não estar presente em alguns deles (WRAY & DAVIES, 2000).

Os bovinos e outros animais comportam-se como portadores assintomáticos, encontrando-se neles, com frequência, *Salmonelas* nas fezes, linfonodos, fígado, vesícula biliar, bexiga, rins, baço e ossos (PARDI et al., 2006). A maioria das infecções é introduzida em rebanhos livres de *Salmonella* pela aquisição de bovinos infectados, seja por bezerros para a criação intensiva ou de adultos para reposições. Animais

comprados podem adquirir a infecção quando em trânsito ou nas revendedoras (WRAY & DAVIES, 2000).

As infecções por *Salmonella* são uma causa importante de mortalidade e morbidade em bovinos, e casos subclínicos são frequentemente encontrados. Animais adultos de todas as idades podem ser afetados. Não há diferenças significativas entre infecções causadas por diferentes sorovares. Na Salmonelose aguda o início é súbito, associado a sintomas como febre, prostração, perda de apetite e queda na produção de leite. A febre geralmente abaixa com o início de uma severa diarreia, variando de aquosa verde-castanho a aquosa fétida contendo sangue, muco e fragmentos necrosados da parede do intestino. Na subaguda, a febre pode ou não estar presente, e os outros sintomas são menos severos (WRAY & DAVIES, 2000).

Há uma grande variação na severidade dos sinais clínicos, e pode ficar difícil determinar se a doença é causada por *Salmonella* ou se ela assume um papel secundário (WRAY & DAVIES, 2000).

Em um frigorífico de Alberta, Canadá, foi isolada *Salmonella* em 0,08% das amostras fecais de bovinos destinados ao abate, não sendo encontrada em vacas de descarte, e variando de 0 a 17% em bovinos jovens (DONKERSGOED et al., 1999). Das 585 amostras de fezes de bovinos leiteiros da Holanda, com sinais atuais ou precoces da Salmonelose por *S. Dublin*, 8,4% foram cultura positivas (VELING et al., 2002).

MADDEN et al. (2001), ao analisarem 200 carcaças bovinas, observaram a presença de *Salmonella* em três (1,5%) delas, sendo duas *S. Mbandaka* e uma *S. Thompson*. Na Irlanda, McEVOY et al. (2003a) encontraram *Salmonella* em 2% das amostras fecais, 2% das amostras ruminais e 7,6% das amostras de carcaça de bovinos colhidas em um abatedouro comercial ao longo de 12 meses. O sorotipo mais prevalente foi a *S. Dublin*, com 72% das amostras positivas.

Entre setembro de 2002 e janeiro de 2003, FEGAN et al. (2004b) isolaram *Salmonella* de 4,5% das amostras de fezes de bovinos criados a pasto e de 9% das fezes de bovinos confinados, em frigoríficos da Austrália. Segundo os autores, a raça

dos animais pode ter contribuído para ausência de diferença significativa entre os sistemas de produção.

Amostras fecais de bovinos em confinamentos de 12 Estados dos USA foram analisadas para a presença de *Salmonella*. Dessas, 6,3% foram cultura positivas, sendo a *S. Anatum* (27,4%) o sorotipo mais isolado (DARGATZ et al., 2003). Na Grã-Bretanha, DAVIES et al. (2004) detectaram 0,2% de amostras positivas em fezes de bovinos saudáveis em abatedouros.

No Vietnã, das 390 amostras de bovinos obtidas, 27,4% foram positivas para *Salmonella*; dentre elas, 37 amostras de fezes, 16 de carcaça e 10 de carne. Os sorovares predominantes foram Anatum, Weltevreden e Lexington, representando 23,8%; 17,5% e 15,8%, respectivamente (VO et al., 2006). LOOPER et al. (2006) encontraram *Salmonella* em 0,5% das amostras fecais de bovinos alimentados com forragem e em 37,9% das amostras fecais de bovinos alimentados com forragem originalmente infectada ou contaminada.

As prevalências médias de Salmonelas em couro e carcaças na pré-evisceração e pós-intervenção em frigoríficos de 4 regiões geograficamente distantes dos EUA foram de 86,6%; 50,2% e 0,8%, respectivamente. O estudo chama a atenção para a importância da transferência de contaminação para a carcaça através da contaminação cruzada durante o seu processo de limpeza (BRICHTA-HARHAY et al., 2008). Com o objetivo de avaliar o efeito de probióticos na propagação de Salmonelas pelas fezes de bovinos confinados naturalmente infectados, TABE et al. (2008) isolaram o patógeno em 12,7%; todas pertencentes ao sorotipo Typhimurium.

No Texas, EUA, MILLER et al. (2008) detectaram Salmonelas em 41% e 50% das amostras de couro analisadas respectivamente, antes e após a exposição à poeira formada durante o carregamento de bovinos criados a pasto. RILEY et al. (2008), ao colherem amostras de bovinos na Flórida e Oklahoma, EUA, identificaram Salmonelas em 0,04% das amostras fecais.

A prevalência de Salmonelas em uma planta de processamento nos EUA variou de 40% a 68%. No couro o microrganismo foi detectado em 7% das amostras, (KALCHAYANAND et al., 2009). Alta prevalência foi descrita em couros (91%) de

bovinos abatidos em frigoríficos de pequeno porte nos EUA por BOSILEVAC et al. (2009). Nas carcaças, a prevalência na pré-evisceração foi de 58%.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Realizar, no período de um ano, o acompanhamento dos controles microbiológicos ambientais e operacionais da rotina durante o abate de bovinos, em um abatedouro-frigorífico habilitado à exportação, procurando relacioná-los às possíveis variações sazonais, aos tipos de terminação dos animais encaminhados para abate e à comprovação da qualidade higiênico-sanitária das operações, procedimentos e da qualidade das carcaças e da carne.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade das operações de abate e a qualidade microbiológica das carcaças com base nos resultados dos controles de rotina (CBT, CT e *E. coli*);
- De acordo com as exigências internacionais, seja do Programa de Redução de Patógenos no abate ou decorrentes de necessidades impostas por importadores, verificar o comportamento, representado pela frequência da ocorrência, dos principais patógenos de importância para a qualidade da carne bovina, quais sejam: *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*;
- Associar os resultados dos controles rotineiros, por meio de métodos indicadores de contaminação, à frequência da ocorrência dos patógenos citados;
- Comparar as estimativas dos microrganismos indicadores em bovinos terminados a pasto e em confinamento;
- Determinar a frequência da ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de carcaça resfriada, associando os resultados em bovinos terminados a pasto e em confinamento;
- Determinar a frequência da ocorrência de *E. coli* O157:H7 em amostras de carcaças resfriadas, associando os resultados em bovinos terminados a pasto e

em confinamento, assim como em amostras de recortes de carne oriundos da desossa (carne industrial); e,

- Determinar a frequência da ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de diferentes ambientes do abatedouro-frigorífico e, nessas, investigar a presença de *L. monocytogenes*.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em um abatedouro-frigorífico localizado no município de Barretos – SP, Brasil, habilitado para comércio nacional e internacional e cujo volume de abate é de aproximadamente 850 animais por dia. As amostras foram analisadas no laboratório do próprio frigorífico, sendo o período experimental de um ano, de novembro de 2008 a outubro de 2009.

4.1 Colheita das amostras

4.1.1 Amostras de ambiente

- **Superfícies de contato**

Seguindo o mesmo procedimento aleatório, com sorteios de locais e objetos a serem amostrados, para a Contagem Bacteriana Total (CBT) ou “Total Viable Count” (“TVC”) durante o período foram colhidas e analisadas 1.192 amostras, perfazendo uma média de 99,3 amostras mensais.

As amostras de superfície foram colhidas antes do início da produção, logo após o enxágue do sanitizante, utilizando um cotonete estéril umedecido em 10mL de BPW. Em superfícies planas foi usado um molde estéril de 20cm², dentro do qual o cotonete foi esfregado 10 vezes no sentido ascendente (de baixo para cima) com pressão firme na superfície, numa inclinação de 45°. As hastes dos suabes foram quebradas na borda interna do tubo diluente, sendo mergulhados no meio de cultura (SILVA et al., 2001; BRASIL, 2003).

- **Pesquisa de *Listeria***

Amostras de superfície de ralos, pisos, evaporadores, esteiras, mesas, dutos e serras foram obtidas por meio de esponjas de celulose estéreis umedecidas e

esfregadas 10 vezes no sentido ascendente (de baixo para cima) por toda a superfície a ser amostrada, priorizando principalmente locais de difícil acesso. As esponjas foram acondicionadas em bolsas plásticas estéreis (Nasco) contendo 10mL de caldo BAX® System *Listeria*. Para essa monitoração há uma rotina semanal a ser desenvolvida, contemplando no mínimo seis (6) pontos de colheita (DUPONT QUALICON, 2005).

Para que possam retratar a realidade e não haver preparação anterior que mascare os resultados que possam ser obtidos, dentre os diversos ambientes industriais há um sorteio imediatamente antes da colheita para definir local e objetos (equipamento ou instalação) a serem amostrados. Assim, apesar da rotina e prévio planejamento, isso torna a amostragem aleatória. A repetição, uma ou mais, se impõe quando da constatação de resultados positivos, isto é, que evidenciam a presença do microrganismo alvo. Isso ocorre para verificação da eficácia das medidas corretivas adotadas e, por tal situação, não há uma equivalência no número de amostras de cada um desses locais. Durante todo o período experimental foram colhidas e analisadas 411 amostras.

4.1.2 Amostras de superfície de carcaças

As amostras foram colhidas pelo método não destrutivo, de acordo com o Regulamento (CE) N^o 2073/2005 da Comissão Européia (CE, 2005). Para isso, foram utilizadas esponjas de celulose estéreis que foram umedecidas e esfregadas numa inclinação aproximada de 45°, 10 vezes no sentido horizontal e 10 vezes no sentido vertical, em uma área de 100cm² (10cm x 10cm), delimitada por um gabarito metálico em 4 regiões das carcaças quentes: pescoço, peito, vazio e região próxima do lagarto; e em 3 regiões das carcaças resfriadas: peito, vazio e região próxima ao lagarto. Ao amostrar a região próxima ao lagarto, a esponja era virada por se tratar de uma área de maior contaminação (Figura 1).

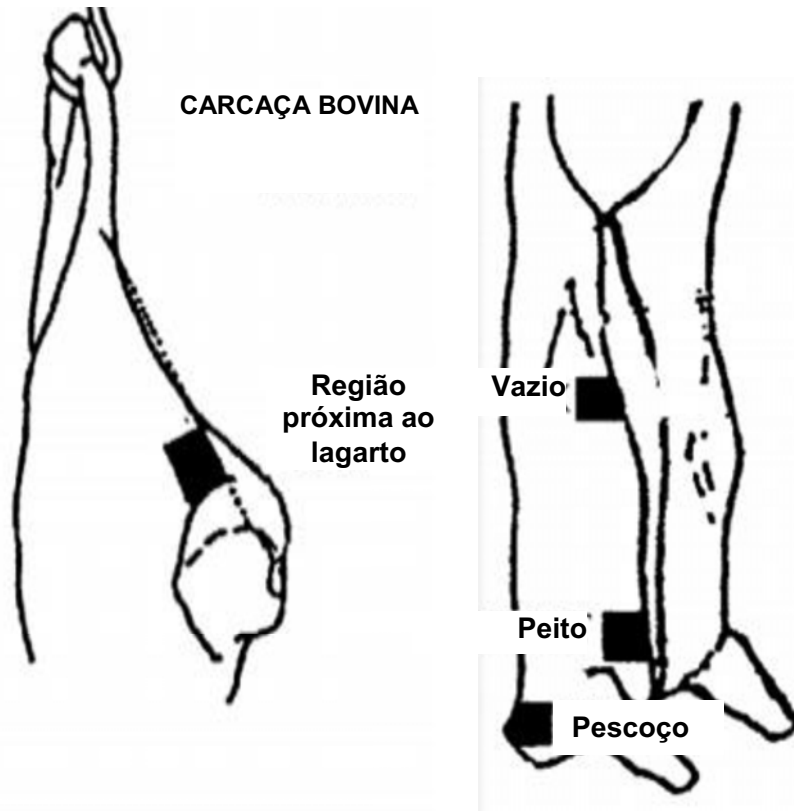


Figura 1. Locais aproximados das carcaças onde foram colhidas as amostras.

Para as estimativas da Contagem Bacteriana Total (CBT ou “TVC”), de Coliformes Totais (CT), de *E. coli* (coliforme fecal ou termotolerante) e para a pesquisa de *Salmonella* spp., as esponjas foram acondicionadas em bolsas plásticas estéreis (Nasco) contendo 10mL de Água Peptonada Tamponada (“BPW”). Para a pesquisa de *E. coli* O157:H7, as esponjas foram acondicionadas em bolsas plásticas estéreis contendo 10mL de Caldo Triptcaseína de Soja (“TSB”).

Para a avaliação da CBT da superfície de carcaças quentes (após o toailete e antes da refrigeração), completou-se um ciclo anual com amostragem ao acaso, colhidas uma vez por semana, num total de 100 amostras, as quais corresponderam a 64 carcaças de animais terminados a pasto e 36 de animais de confinamentos. Além dessas, outras 100, 50 de cada tipo de terminação foram amostradas para finalidades comparativas entre os tipos de terminação.

As pesquisas de Coliformes Totais e de *E. coli* O157:H7 não fazem parte da rotina dos controles operacionais, assim sua amostragem ficou reduzida às 100 carcaças do experimento comparativo entre os tipos de terminação, com 50 amostras para cada um. Para a pesquisa de *E. coli* em meias-carcaças resfriadas, no período foram colhidas e analisadas 775 amostras, 100 do experimento comparativo (50 de cada terminação) e 675 referentes à rotina dos controles operacionais, com uma média de 64,6 amostras por mês.

A pesquisa de *Salmonella* spp. em meias-carcaças resfriadas é realizada em ciclos de 82 amostras, com uma amostra aleatória por dia. Além das amostras correspondentes a dois ciclos completos, foram analisadas outras 100 amostras do experimento comparativo entre as terminações, totalizando 264 amostras; e correspondendo a 196 carcaças de animais terminados a pasto e 68 terminados em confinamento.

4.1.3 Amostragem comparativa

Para a realização do estudo comparativo foram obtidas amostras de 100 bovinos machos, clinicamente sadios, entre novembro de 2008 e fevereiro de 2009, com 50 animais provenientes de fazendas com terminação a pasto e 50 de fazendas com terminação em confinamento. De cada propriedade foram colhidas, aleatoriamente, amostras de 5 animais, totalizando 10 fazendas com sistema extensivo (8 do Estado de São Paulo, 1 de Minas Gerais e 1 de Goiás) e 10 com sistema intensivo (9 de Minas Gerais e 1 de Goiás). De todos os animais foram colhidas amostras de superfície de meia-carcaça quente, para CBT, e amostras de superfície de meia-carcaça resfriada, para pesquisa de *Salmonella* spp., Coliformes Totais, *E. coli* e *E. coli* O157:H7.

Somando-se a estas, foram amostradas 64 meias-carcaças quentes de bovinos terminados a pasto (26 do Estado de São Paulo, 24 de Minas Gerais e 14 de Goiás) e 36 de bovinos de confinamentos (26 de Goiás e 10 do Estado de São Paulo) para CBT; 146 (61 de Goiás, 50 de Minas Gerais, 29 do Estado de São Paulo, 4 do Pará e 2 do Mato Grosso do Sul) e 99 (50 de Minas Gerais, 22 de Goiás, 21 do Estado de São

Paulo e 6 do Mato Grosso do Sul) meias-carcaças resfriadas de bovinos criados a pasto e 18 (12 do Estado de São Paulo, 5 de Minas Gerais e 1 de Goiás) e 112 (67 do Estado de São Paulo, 23 de Goiás e 22 de Minas Gerais) de bovinos criados em confinamento para pesquisa de *Salmonella* spp. e *E. coli*, respectivamente.

Terminada a coleta, todas as amostras foram colocadas dentro de uma bolsa térmica e levadas imediatamente ao laboratório do próprio frigorífico, localizado a cerca de 30m de distância da planta de abate, para início das análises.

4.1.4 Amostras de recortes cárneos

Com o intuito de verificar a presença de *E. coli* O157:H7 em recortes cárneos, foram colhidas aleatoriamente em sacos plásticos estéreis, 50g de 5 caixas de recortes a cada hora de produção, totalizando amostras em “pool” de 250g. Além das 67 amostras colhidas durante os experimentos comparativos entre diferentes terminações, outras 256 amostras de recortes foram colhidas durante o ano, geralmente uma por dia de produção, totalizando 323 amostras que foram analisadas (DUPONT QUALICON, 2005).

4.2 Enumeração de microrganismos indicadores pelo método Petrifilm

4.2.1 Preparo das amostras para análise

Para a CBT, foram adicionados às bolsas, contendo as esponjas, 90mL de BPW e 30mL aos tubos diluentes contendo os cotonetes, completando 100mL e 40mL, respectivamente. Já para a contagem de Coliformes Totais e *E. coli*, um volume de 15mL foi adicionado às bolsas, totalizando 25mL. A homogeneização das bolsas foi feita em “stomacher” por um minuto a 200rpm e dos tubos diluentes em “vortex” a 2800rpm.

4.2.2 Petrifilm™

A técnica de Petrifilm utilizada foi de acordo com o Método Oficial AOAC. Placas Petrifilm AC (ISO 4833:2003) foram utilizadas para CBT e placas Petrifilm EC (ISO 21528-2:2004) para contagem de Coliformes Totais e *E. coli*.

A placa Petrifilm é um sistema pronto de meio de cultura. O Petrifilm AC contém nutrientes do ágar padrão, um agente geleificante solúvel e um indicador tetrazólio. Já as placas Petrifilm EC, possuem nutrientes do vermelho violeta bile, um agente geleificante e um indicador de atividade glicuronidásica. Os Coliformes fermentam a lactose do meio produzindo gás, que é aprisionado em volta da colônia. Devido a produção de gás, o pH do indicador diminui e o gel se colore de vermelho escuro. *E. coli*, por sua vez, produz glucuronidase, que reage com o indicador formando um precipitado azul em volta da colônia, permitindo sua identificação visual (3M, 2004; FENG et al., 2002).

Após a homogeneização, transferiu-se 1mL de cada amostra contida nas bolsas para a superfície das placas Petrifilm, procedendo-se de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 48h na posição horizontal, com o lado transparente voltado para cima (3M, 2004).

Para a contagem, foram selecionadas placas Petrifilm AC que apresentaram até 250 colônias. As colônias vermelhas, independentemente do tamanho ou intensidade, foram contadas como microrganismos viáveis. O número de colônias encontrado na placa dividido por 4 nas amostras de carcaça e por 0,5 nas amostras de ambiente, forneceu o número de microrganismos viáveis por cm².

Quanto ao Petrifilm EC, placas com até 150 colônias foram incluídas na contagem. As colônias vermelhas associadas à produção de gás foram contadas como Coliformes Totais e as colônias azuis associadas à produção de gás, como *E. coli*. Dividindo-se o valor encontrado por 12, obteve-se o número de Coliformes Totais ou de *E. coli* por cm². Os resultados das contagens foram expressos em log₁₀ unidades formadoras de colônia (UFC) por unidade de área (cm²), exceto para CBT em

superfícies, cujos valores foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por unidade de área (cm²).

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (DUPONT QUALICON, 2005)

4.3.1 Preparo das amostras para análise

Ambiente: Para a pesquisa de *Listeria* spp. foram adicionados 25mL do caldo BAX® System *Listeria* nas bolsas plásticas contendo as esponjas estéreis, completando 35mL. As bolsas foram homogeneizadas em “stomacher” por um minuto a 200rpm e incubadas em estufa a 30±1°C por 22 a 26h. Após a aplicação da PCR pelo BAX® System, as amostras positivas foram investigadas quanto a presença de *L. monocytogenes*. Aliquotas de 0,1mL do pré-enriquecimento primário foram transferidas para tubos de ensaio de tampa rosqueável de 10mL, sendo acrescentado a eles 9,9mL do pré-enriquecimento secundário chamado MOPS-BLEB. Os tubos de ensaio foram então homogeneizados em “vortex” a 2800rpm e incubados a 36±1°C por 18 a 24h.

Carcaças: Para a pesquisa de *Salmonella* spp. foram adicionados 50mL de BPW em bolsas plásticas contendo as esponjas estéreis, completando 60mL. Já para a pesquisa de *E. coli* O157:H7, foram adicionados 90mL de TSB, completando 100mL. As bolsas foram homogeneizadas em “stomacher” por um minuto a 200 rotações por minuto (rpm) e incubadas em estufa a 36±1°C por 18 a 24h.

Recortes cárneos: De cada amostra foi retirada 25g para a pesquisa de *E. coli* O157:H7, pesada em bolsa estéril. Foi transferido 225mL de caldo TSB e homogeneizado em “stomacher” por um minuto a 200rpm. A incubação foi realizada em estufa por 18 a 24h a 36±1°C .

4.3.2 BAX® System

Após o período de pré-enriquecimento, as amostras de carcaças resfriadas e de ambiente foram submetidas à análise pela reação de PCR, no BAX® System. Foi retirada uma alíquota de 5µL de cada amostra, sendo adicionada em microtubos contendo 200µL de lise-protease. Primeiramente, os microtubos foram levados para o 1º bloco aquecedor a 37°C por 20min para análise de *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 e a 55°C por 60min para análise de *Listeria* spp e *L. monocytogenes*. Após o término do tempo, os microtubos foram transferidos para o 2º bloco aquecedor a 95°C por 10 min. Em seguida, foram colocados em bloco de resfriamento por cerca de 5 min. Alíquotas de 50µL foram transferidas para tubos contendo pastilhas de PCR, alojados em uma “rack”. Por fim, a “rack” contendo os tubos de PCR foi levada ao termociclador para posterior detecção dos patógenos (DUPONT QUALICON, 2005).

Juntamente com as amostras e sempre que ocorria a mudança de lote dos kits, foram realizados controles positivos com cepas adquiridas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, SP), com exceção da cepa de *E. coli* O157:H7, cedida gentilmente pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

4.4 Critérios para interpretação dos resultados

Embora haja ampla variação na literatura e até mesmo a diferenciação entre critérios higiênicos, que são utilizados para avaliar se as operações estão sendo realizadas adequadamente, e critérios de segurança do alimento, que são utilizados para avaliar a segurança de consumo de lotes ou partidas, optou-se por utilizar critérios uniformes definidos pela “Food Standards Agency”, UK (FSA, 2010) (Tabela 1), como uma forma de possibilitar comparações com padrões internacionais. Assim, para amostragem com suabes ou esponjas em superfícies de carcaças, esse critério subdivide os resultados em três categorias: Satisfatória – correspondendo à faixa ideal ou adequada, Aceitável – como uma faixa intermediária também compreendida como

qualidade marginal, e Insatisfatória – cujos resultados excedem os adequados ou esperados, caracterizando condição inadequada.

Para fins de verificação da limpeza e desinfecção, a Decisão 2001/471/CE estabeleceu apenas duas categorias de resultados para CBT em superfícies variadas: Aceitável e Não aceitável (BRASIL, 2001).

O controle de *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo tem como objetivo a tolerância zero, o que não se aplica às carnes “in natura”; no entanto, a aplicação dos princípios baseados em PPHO nos processos de abate e preparação de cortes, permite a redução deste patógeno nos produtos por eles produzidos. Resultados positivos frequentes (mais de dois) em amostras ambientais para *Listeria* spp. indicam a necessidade de realização de testes no produto final para avaliar a inocuidade do mesmo. Já para testes em superfícies de contato com os produtos, resultados positivos para *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. indicam que o produto final teve contato e pode estar contaminado com *L. monocytogenes* (BRASIL, 2004).

Tabela 1. Esquema de interpretação dos resultados de diferentes métodos de análise de carcaça, de acordo com critérios internacionais estabelecidos pela “Food Standards Agency” – UK, 2005. Barretos-SP, 2010.

Análise	Unidade/Interpretação	Satisfatório	Aceitável	Insatisfatório
CBT	Log ₁₀ UFC/cm ²	< 2,8	2,8 - 4,3	> 4,3
Coliformes	Log ₁₀ UFC/cm ²	< 0,8	0,8 - 1,8	> 1,8
<i>E. coli</i>	Log ₁₀ UFC/cm ²	< 0,8	0,8 - 1,8	>1,8
<i>Salmonella</i> spp.	Positivo/Negativo	Ausência	≤ 2 em 5	> 2 em 5
<i>E. coli</i> O157:H7	Positivo/Negativo	Ausência	Ausência	Presença

Para a determinação dos períodos chuvoso e seco, utilizada na comparação dos resultados das estimativas de microrganismos indicadores e de *Listeria* spp., foram

utilizados os dados meteorológicos (Temperatura média - °C e Precipitação pluviométrica - mm) mensais, de novembro de 2008 a outubro de 2009, para o município de Jaboticabal-SP, obtidos da Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal, latitude 21°14'05"S, longitude 48°17'09"W e altitude 615,01m.

4.5 Análise Estatística

As contagens de microrganismos indicadores, tanto nas superfícies de contato com alimentos, quanto de carcaças, foram submetidas à análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis (ZAR, 1999). Quando significativo, foi aplicado o teste de Dunn (HOWELL, 1982), para comparações das médias duas a duas. Os dados das tabelas de contingência foram analisados pelo teste qui-quadrado. Todos os resultados estatísticos deste trabalho foram obtidos nos programas GraphPad Prism 4 (MOTULSKY, 2003) e SAS 9.1 (DER & EVERITT, 2002), em que um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controles Operacionais e Ambientais

5.1.1 Controle das Superfícies de Contato com Alimentos

- **Contagem Bacteriana Total**

No período foram analisadas 1.192 amostras de superfícies variadas, correspondentes às principais seções do estabelecimento de abate em que há a manipulação de produtos destinados ao consumo humano. Assim, foram colhidas e analisadas 213 amostras das superfícies de contato da sala de abate, 187 amostras do setor de cortes, 223 amostras da desossa, 225 da seção de miúdos comestíveis, 146 do setor de conservas e 198 do setor de porcionados (Tabela 2).

O valor médio para CBT encontrado foi de $7,75 \times 10 \pm 1,14 \times 10^2$ UFC/cm² ($1,9 \pm 2,1 \log_{10}$ UFC/cm²), com variação entre 0 e $4,6 \times 10^2$ UFC/cm² ($2,7 \log_{10}$), diferindo estatisticamente entre os meses do ano e setores amostrados ($p < 0,0001$).

De acordo com os padrões da Decisão 2001/471/CE, os resultados demonstraram condição higiênica aceitável em 51,1% do total, ou seja, 609 amostras. As demais 583 amostras, 48,9%, evidenciaram resultados considerados não aceitáveis que, na prática, demandam providências por meio de ações corretivas (BRASIL, 2001).

A Figura 2, que reúne a totalidade dos dados mensais de todos os locais amostrados, é útil para evidenciar dificuldades sazonais, associadas a fatores climáticos como época das águas e da seca e variações de temperatura, como calor e frio, desde que excluídas outras causas de variação. Assim, observa-se que no período mais chuvoso e quente, de novembro a março, a proporção de resultados não aceitáveis foi superior à de aceitáveis, com exceção para o mês de março, embora esse fato tenha ocorrido também nos meses de abril, maio e junho. Já, de julho a outubro, no que predomina tempo mais seco e temperaturas mais amenas, ocorreu o inverso, com maioria de resultados aceitáveis.

Tabela 2. Resultados da Contagem Bacteriana Total (CBT) em amostras de superfícies de contato com alimentos variadas, nos diferentes setores do estabelecimento de abate segundo Decisão 2001/471/CE. Barretos-SP, 2010.

Classificação	Aceitável	%	Não aceitável	%	Total
Abate	79	37,1	134	62,9	213
Cortes	109	58,3	78	41,7	187
Desossa	107	48,0	116	52,0	223
Miúdos	154	68,4	71	31,6	225
Conserva	61	41,8	85	52,8	146
Porcionados	99	50,0	99	50,0	198
Total	609	51,1	583	48,9	1.192

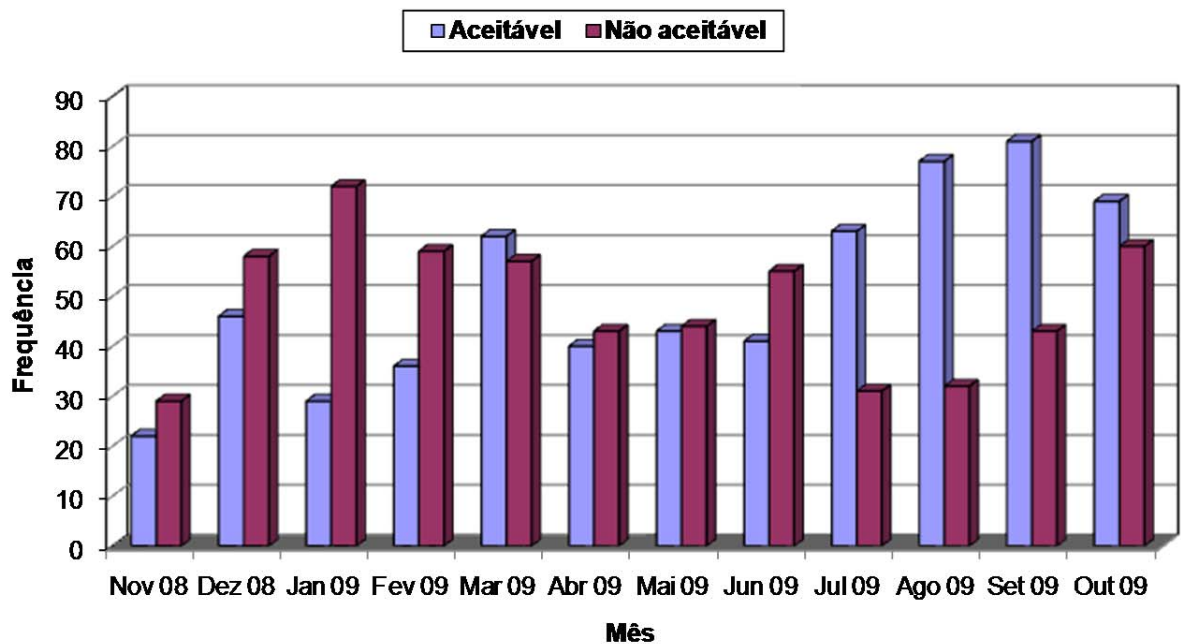


Figura 2. Resultados comparativos das condições de todas as superfícies de contato com alimentos amostradas mensalmente e determinadas pela CBT, durante o período de um ano.

A população média de microrganismos viáveis no período chuvoso ($9,92 \times 10 \pm 1,21 \times 10^2$ UFC/cm²) foi maior e diferiu estatisticamente ($p < 0,0001$) daquela encontrada no período seco ($6,3 \times 10 \pm 1,06 \times 10^2$ UFC.cm⁻²). Das 470 amostras analisadas no período chuvoso, 195 (41,5%) foram classificadas como aceitáveis e 275 (58,5%) como não aceitáveis; já no período seco, foram descritos 414 (57,3%) resultados aceitáveis e 308 (42,6%) não aceitáveis (Figura 3).

Amostras de suabe (10cm²) obtidas a partir de superfícies de contato com alimentos (correias, facas, tábuas de corte, etc) nas linhas de fabricação, de carne moída e de embalagem, foram testadas para CBT por EISEL et al. (1997) nos Estados Unidos. As contagens em log₁₀ ficaram frequentemente entre 2,2 UFC/cm² e 3,7 UFC/cm², muito próximas das encontradas no presente estudo, sendo as maiores estimativas presentes nas correias da linha de fabricação. Segundo os autores, as superfícies de contato com alimentos provavelmente não são fontes de contaminação microbiana global, contudo, a limpeza eficiente somada a programas de saneamento e procedimentos para o manuseio seguro de alimentos, são importantes para assegurar um produto de alta qualidade.

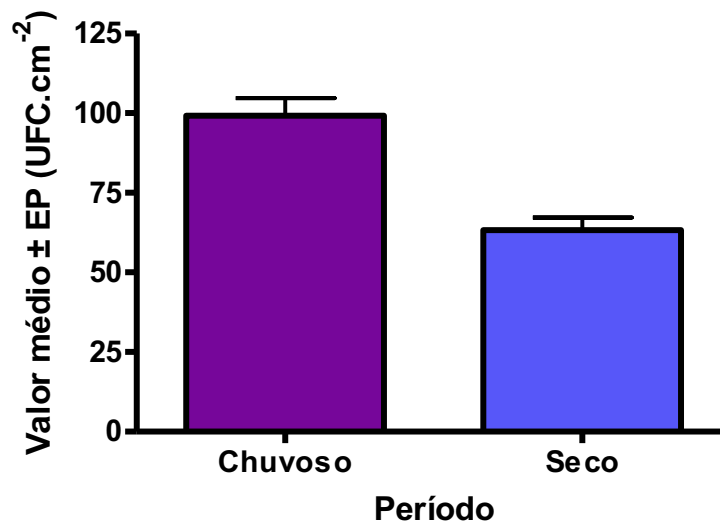


Figura 3. Resultados da CBT em superfícies de contato com alimentos de acordo com os períodos do ano (chuvoso e seco) (EP: Erro Padrão).

GILL et al. (1999) revelaram, em inspeção cuidadosa de equipamentos higienizados, locais obscuros que abrigavam detritos com um grande número de bactérias aeróbias. As estimativas de CBT ficaram entre 1,57 e 5,08 \log_{10} UFC/cm² após a limpeza, com médias variando entre 2,77 e 2,84 \log_{10} UFC/cm², após a produção normal de 1h.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da CBT em algumas superfícies amostradas. Pelo teste qui-quadrado existe uma dependência entre a classificação (aceitável/não aceitável) e a superfície ($p < 0,0001$). Dentre elas, o avental apresentou o maior índice de resultados não aceitáveis (70,5%), seguido das amostras de equipamentos (serra/fatiadora/moedor), com 51,8%, constituindo-se em problema operacional e necessidade de medidas corretivas. Por outro lado, as amostras de superfícies de utensílios, como de faca/gancho/gancheira, mostraram-se aceitáveis em 63,5% delas.

Tabela 3. Resultados da Contagem Bacteriana Total (CBT) em amostras de superfícies de contato com alimentos, de diferentes setores do estabelecimento de abate, segundo Decisão 2001/471/CE. Barretos-SP, 2010.

Superfície	Aceitável	%	Não aceitável	%	Total
Avental	43	29,5	103	70,5	146
Chute/Esteira/Mesa (CEM)	153	52,6	138	47,4	291
Faca/Gancho/Gancheira (FGG)	176	63,5	101	36,5	277
Luva/Mãos (LM)	76	55,9	60	44,1	136
Serra/Fatiadora/Moedor (SFM)	66	48,2	71	51,8	137
Total	514	52,1	473	47,9	987

EUSTACE et al. (2007) analisaram facas usadas por operadores no processo de abate, imediatamente após a limpeza, e obtiveram uma CBT média variando entre 1,78

e $2,18 \log_{10}$ UFC/cm², semelhante à média geral observada na presente pesquisa. GILL & McGINNIS (2000) encontraram populações de bactérias aeróbias em todas as luvas de aço inoxidáveis amostradas, com números de \log_{10} entre 1 e 8/luva e, na minoria de luvas de borracha, com números de $\log_{10} < 2$ /luva. Em equipamentos, estimativas elevadas, de $>6 \log_{10}$ /amostra, foram detectadas na maioria dos detritos que permaneceram em áreas obscuras após o processo de limpeza.

Resultados superiores foram obtidos por GILL & JONES (1999), que ao analisarem amostras de luvas usadas por trabalhadores na serragem de carcaças suspensas, encontraram valores médios para CBT de $6,5 \log_{10}$ UFC, $7,9 \log_{10}$ UFC e $9,2 \log_{10}$ UFC/luva para suabes de luvas de algodão, amostras de lavagem de luvas de algodão e amostras de lavagem de luvas de aço inoxidável, respectivamente.

O setor de abate (Figura 4) mostrou-se o mais problemático, com 37,1% (79) das amostras classificadas como aceitáveis e 62,9% (134) como não aceitáveis. Sistemáticamente, em 8 dos 12 meses de estudo foram observados resultados não aceitáveis superiores aos aceitáveis, com exceção para os meses de novembro, julho, agosto e setembro. De novembro a fevereiro e de abril a junho observou-se a ocorrência de resultados não aceitáveis em contínua ascensão.

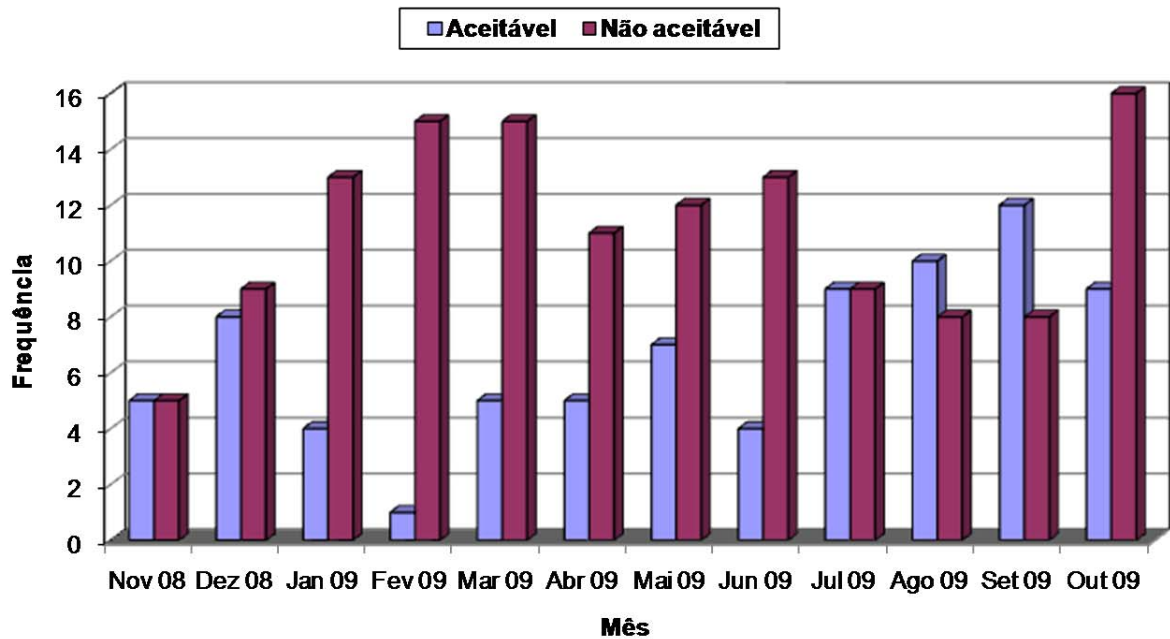


Figura 4. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de abate, durante o período de um ano.

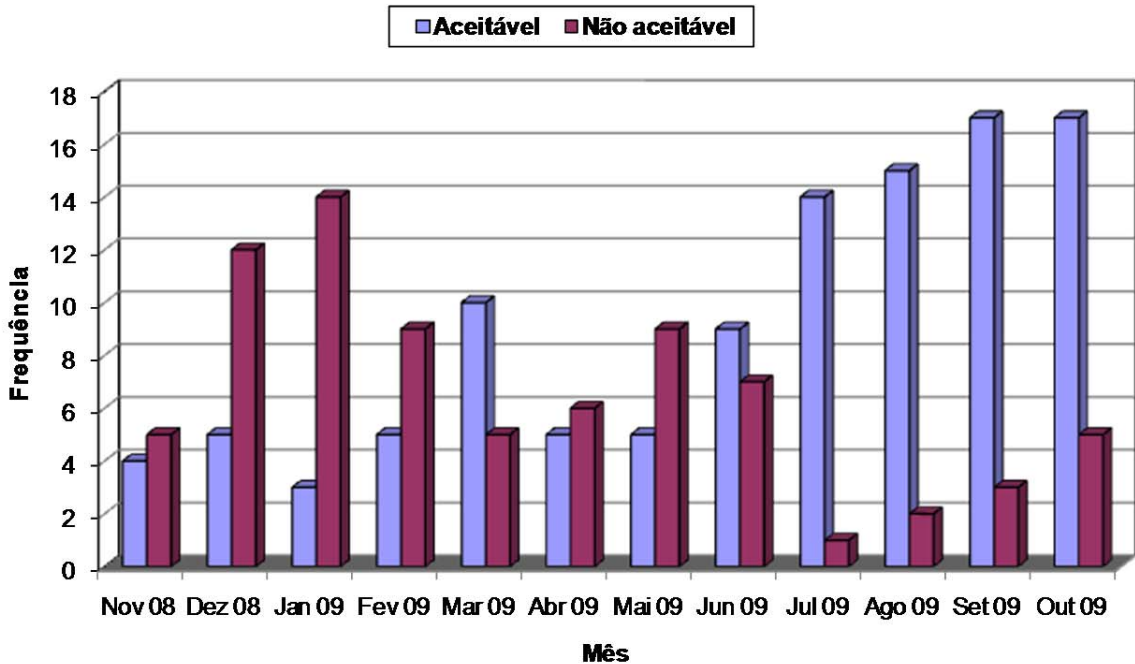


Figura 5. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de cortes, durante o período de um ano.

Observando a Figura 5, verifica-se que os maiores índices de resultados aceitáveis no setor de cortes ficaram concentrados entre os meses de julho e outubro. Com exceção do mês de março e junho, os demais meses do experimento apresentaram resultados não aceitáveis superiores aos aceitáveis. Em 109 (58,3%) das 187 amostras colhidas foram observados resultados aceitáveis, ao passo que as demais 78 (41,7%) amostras, mostraram-se não aceitáveis.

A Figura 6 ilustra a alternância entre resultados proeminentemente aceitáveis e não aceitáveis ao longo do período de estudo no setor de desossa. Ao total, foram detectadas 48% (107) de amostras aceitáveis e 52% (116) de amostras não aceitáveis.

Todas as superfícies (mesas, correias transportadoras, aventais, mãos e luvas) amostradas na sala de desossa em um frigorífico de grande porte apresentaram contagens de microrganismos viáveis bem superiores ($>10^4$ UFC/cm²) à média encontrada neste trabalho. Os números elevados podem ser explicados, de acordo com os pesquisadores, por superfícies altamente contaminadas e/ou altos níveis de umidade durante a amostragem, nos pontos escolhidos para a colheita (SHALE et al., 2006).

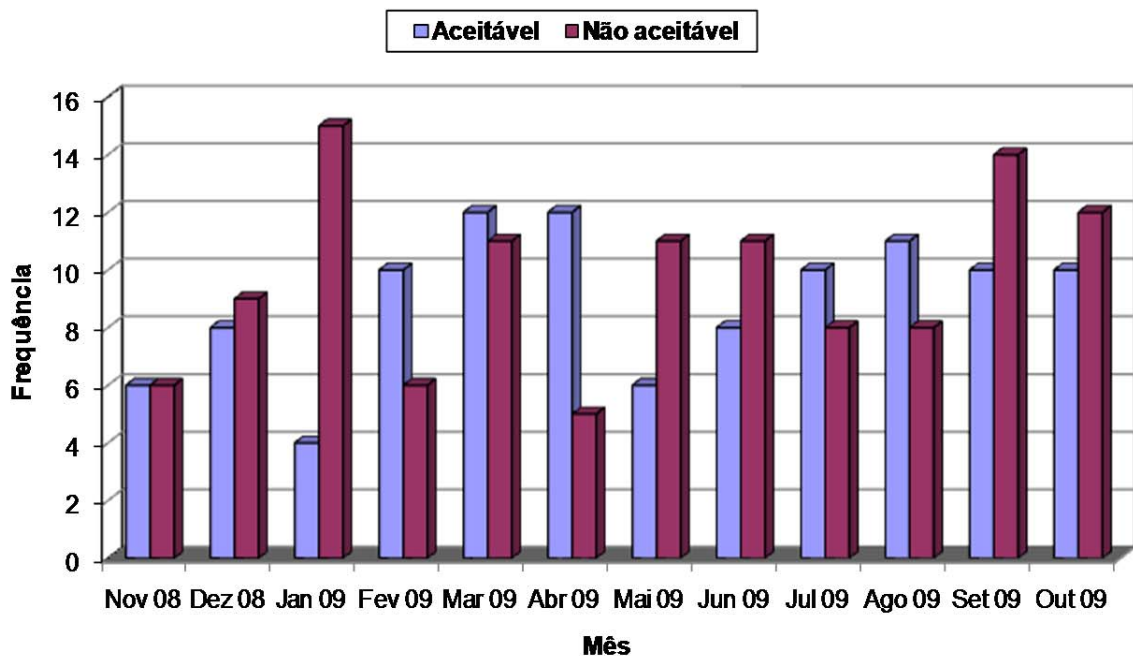


Figura 6. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de desossa, durante o período de um ano.

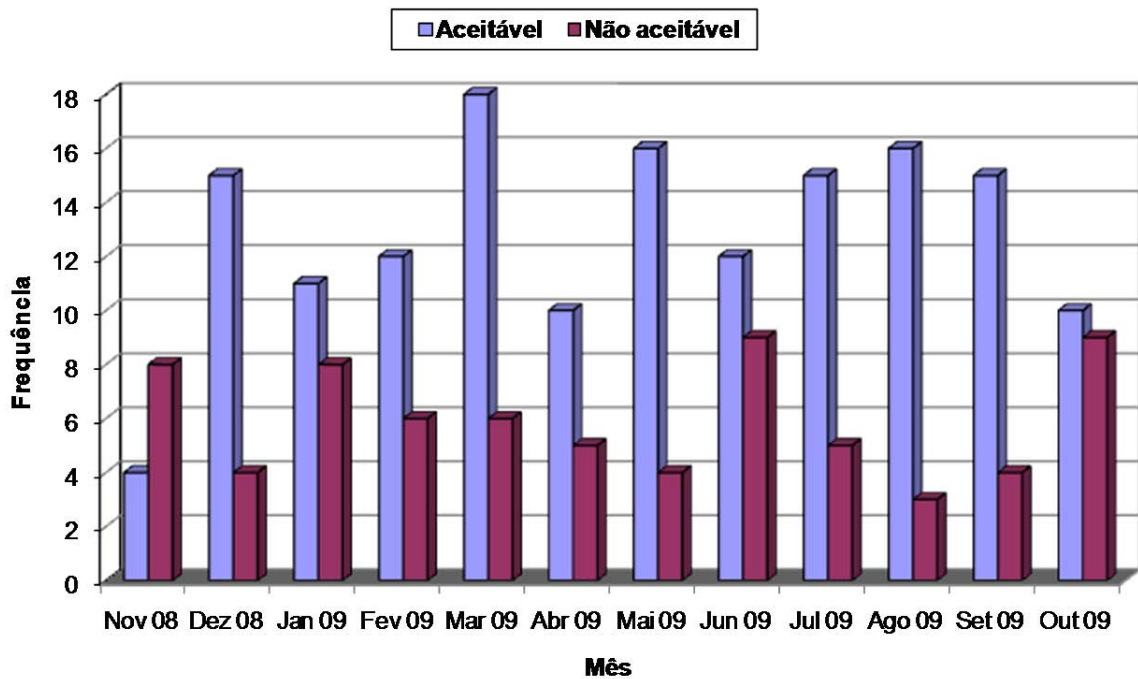


Figura 7. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de miúdos comestíveis, durante o período de um ano.

No setor de miúdos, somente no mês de novembro foram demonstrados resultados aceitáveis sistematicamente inferiores aos não aceitáveis (Figura 7). Nos meses restantes, ou seja, de dezembro a outubro, os resultados aceitáveis foram superiores aos não aceitáveis. Foram encontradas 154 amostras aceitáveis, o que equivale a 68,4% do total, superior a todos os outros setores analisados, e 71 (31,6%) amostras não aceitáveis.

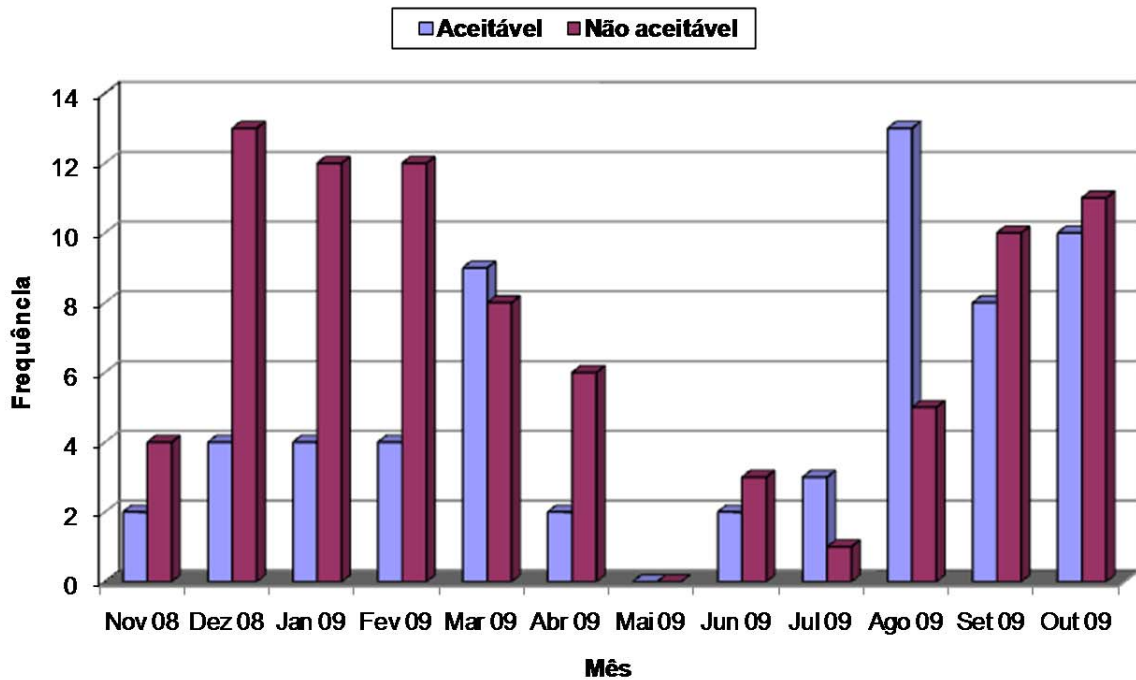


Figura 8. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de conservas, durante o período de um ano.

Pela Figura 8 pode-se observar que no mês de maio não houve coleta de amostras no setor de conservas. Os maiores índices de resultados não aceitáveis se concentraram entre dezembro e fevereiro e nos meses de setembro e outubro. Somente nos meses de março, julho e agosto, os resultados aceitáveis foram superiores aos não aceitáveis. Um total de 41,8% (61) e 58,2% (85) das amostras de superfícies apresentaram-se aceitáveis e não aceitáveis, respectivamente.

De acordo com a Figura 9, o período de dezembro a abril reuniu a maioria dos resultados não aceitáveis no setor de porcionados, já de julho a outubro, os resultados aceitáveis. Das 198 amostras, 50% (99) foram classificadas como aceitáveis e 50% (99) como não aceitáveis.

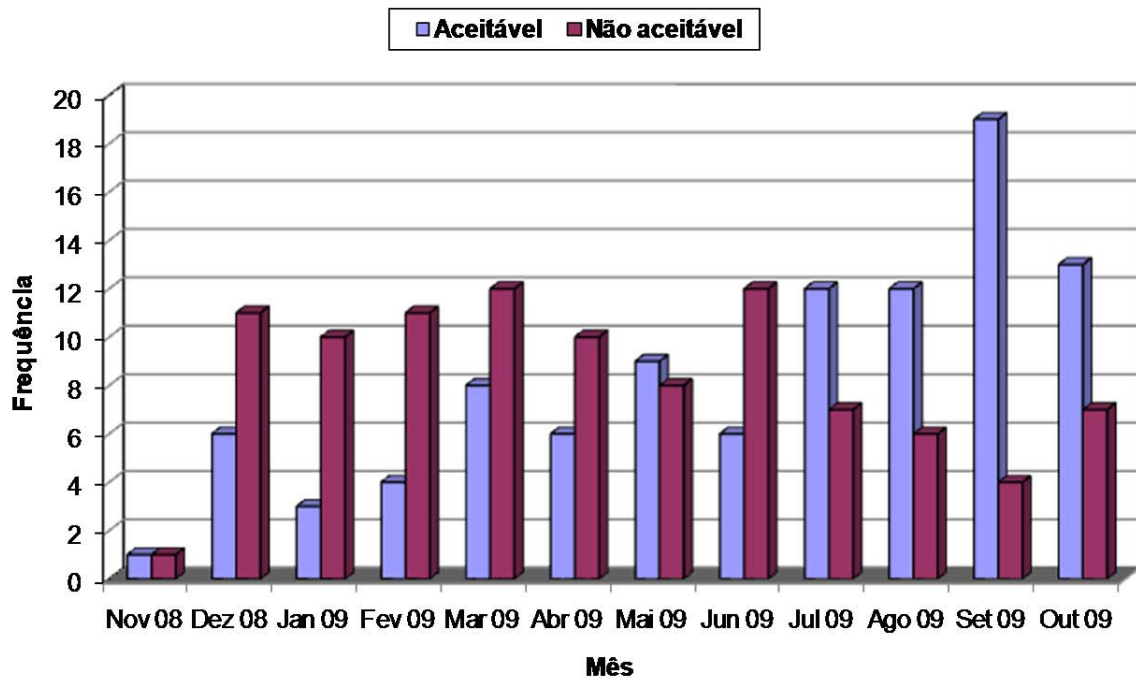


Figura 9. Sequência mensal de resultados da CBT de superfícies de contato com alimentos para a área de porcionados, durante o período de um ano.

- ***Listeria spp.***

A pesquisa ambiental de *Listeria* foi realizada num total de 411 amostras (Tabela 4). Dessas, 84,9% (349) resultaram negativas. Entretanto, um valor elevado de amostras, 62 ou 15,1%, resultou positiva para a presença de *Listeria spp.* Dessas, também com valores elevados e relativa persistência no ambiente de abate, 21 amostras ou 5,1% do total amostrado, resultaram positivas para *Listeria monocytogenes*. Exceção feita para os meses de abril, julho, agosto e setembro de 2009, em todos os demais meses do período houve a detecção de *Listeria monocytogenes* em uma ou mais amostras (Figura 10).

Apesar da Circular nº 354/2004 do DIPOA, não estabelecer limites para as estimativas de *Listeria spp.* e *L. monocytogenes*, resultados positivos frequentes (mais de dois) em amostras ambientais para *Listeria spp.*, indicam a necessidade de realização de testes no produto final para avaliar a inocuidade do mesmo. Sendo assim,

Tabela 4. Resultados das análises ambientais de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*, em diferentes setores do estabelecimento de abate. Barretos-SP, 2010.

Mês/Ano	Negativa	<i>Listeria</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	Total
Nov 08	14	2	1	16
Dez 08	22	8	6	30
Jan 09	18	4	3	22
Fev 09	64	7	6	71
Mar 09	36	1	1	37
Abr 09	37	1	0	38
Mai 09	22	3	1	25
Jun 09	22	14	1	36
Jul 09	26	10	0	36
Ago 09	30	3	0	33
Set 09	32	5	0	37
Out 09	26	4	2	30
Total	349	62	21	411

valores elevados, como os encontrados no presente trabalho, são importantes para avaliar os programas sentinelas, buscando a ausência de contaminação do produto final, no caso, a carcaça bovina, por estes patógenos.

De acordo com o teste qui-quadrado, a presença de *Listeria* spp. diferiu estatisticamente entre os meses do ano ($p=0,0002$), no entanto, quando testou-se a independência de sua ocorrência entre os períodos seco e chuvoso, o mesmo não foi significativo ($p=0,2051$). Das 176 amostras analisadas no período chuvoso, 22 (12,5%) foram positivas para *Listeria* spp., valor este muito próximo dos encontrados na período seco, com 40 (17%) amostras positivas, em 235 pesquisadas (Figura 11). GUDBJORNSDÓTTIR et al. (2004) relataram resultado semelhante, ao analisarem

1.689 amostras de ambientes coletadas em plantas processadoras de carnes, frutos do mar e aves, e observarem a falta de sazonalidade na frequência de *L. monocytogenes*.

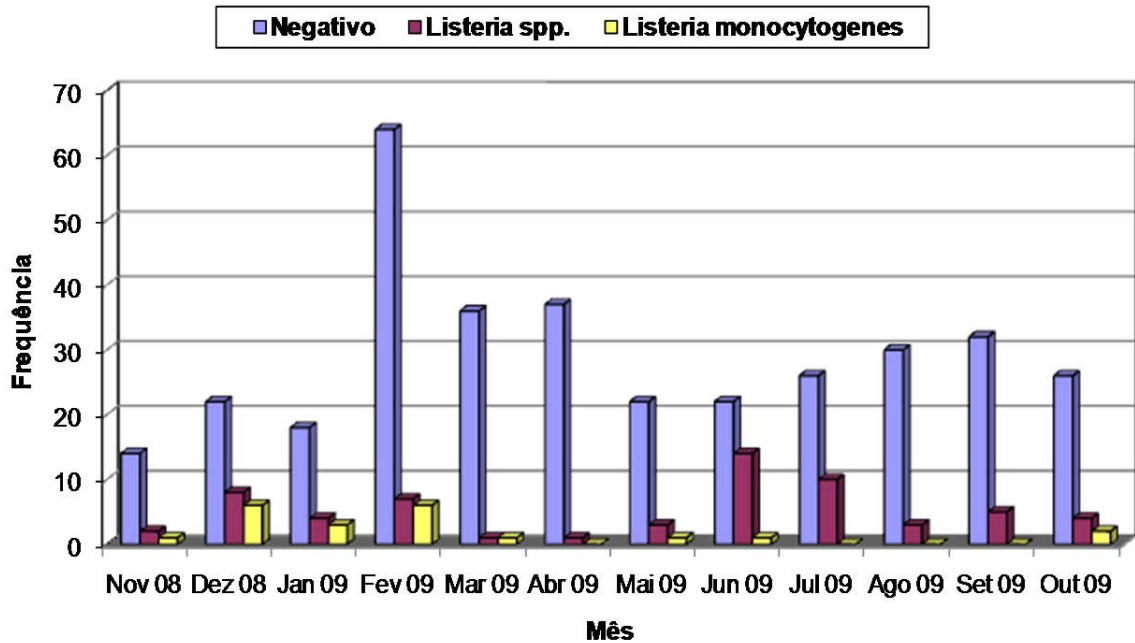


Figura 10. Resultados mensais da pesquisa de *Listeria spp.* e de *Listeria monocytogenes* nos diferentes locais amostrados, durante o período de um ano.

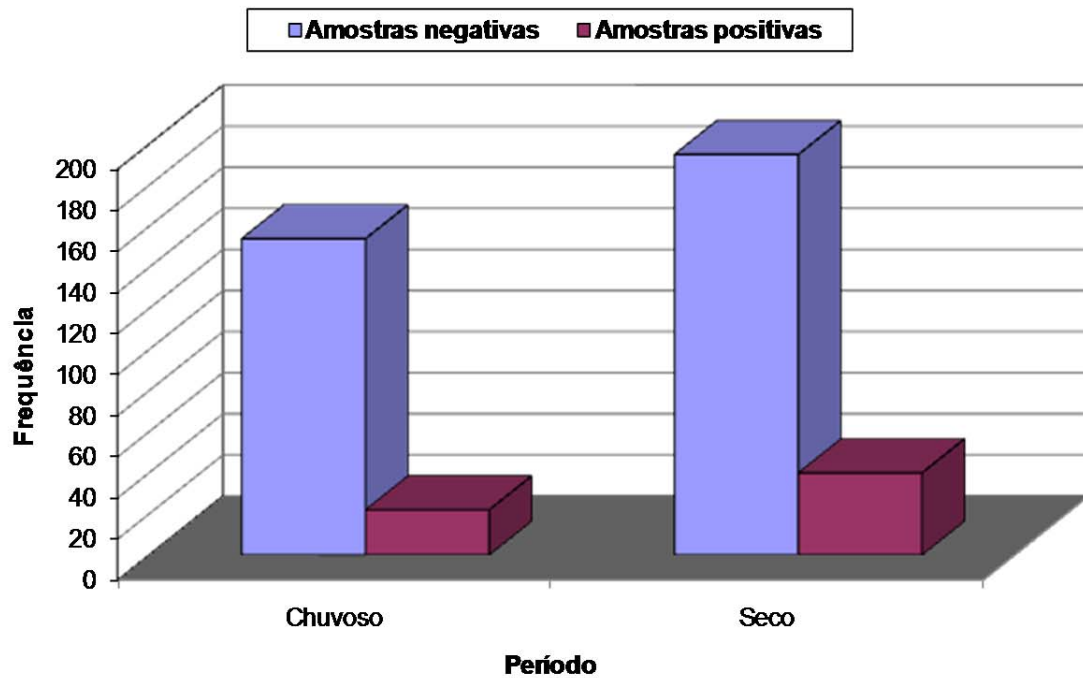


Figura 11. Resultados da pesquisa de *Listeria* em superfícies, de acordo com os períodos do ano (chuvoso e seco).

Valor muito próximo ao presente estudo foi descrito por SAMELIS & METAXOPOULOS (1999) ao isolarem *Listeria* spp. em 14,3% dos equipamentos amostrados. Contudo, em 68,8% dessas amostras foi observada a presença de *L. monocytogenes*, indicando baixa eficiência nos procedimentos de desinfecção. Resultado um pouco inferior foi relatado por GUDBJORNSDÓTTIR et al. (2004) em amostras ambientais na Europa, sendo a taxa de incidência de 11,9% para *L. monocytogenes*, onde a maioria (65,8%) era proveniente de equipamentos, correias transportadoras, bandejas e outros transportadores. Após a higienização, 11,5% das amostras ainda estavam contaminadas com *Listeria* spp. e 8,3% com *L. monocytogenes*, indicando insuficiência nos processos de limpeza.

Todavia, em estabelecimentos processadores de carne no Brasil, BARROS et al. (2007) encontraram valores bem acima dos anteriormente relatados. Em 51,4% e 35,4% das amostras de superfícies de equipamentos e de ambientes, respectivamente, foi detectada a presença de *Listeria* spp.

Em relação à pesquisa de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* nos diferentes setores do estabelecimento de abate, com exceção dos meses de novembro, fevereiro e outubro, todos os demais meses do experimento prevaleceu a coleta de amostras no setor da desossa. O maior volume de amostras foi registrado no mês de fevereiro (71), destacando o setor de conserva com 26 amostras para o mesmo período com diferença estatística entre os diferentes setores, quanto à presença de *Listeria* spp. ($p=0,02$).

Verifica-se, na Figura 12, que somente nos meses de junho e agosto, quando predomina tempo mais seco e frio, houve detecção de *Listeria* spp. no setor de abate. Das 56 amostras analisadas, 2 (3,6%) apresentaram-se positivas.

No setor das câmaras, a presença de *Listeria* spp. foi observada nos meses de dezembro e fevereiro, de maio a julho e no mês de outubro. No total, foram colhidas 64 amostras, sendo 9 (14,1%) positivas. O mês de junho apresentou o maior índice de positividade, com 3 amostras (Figura 13).

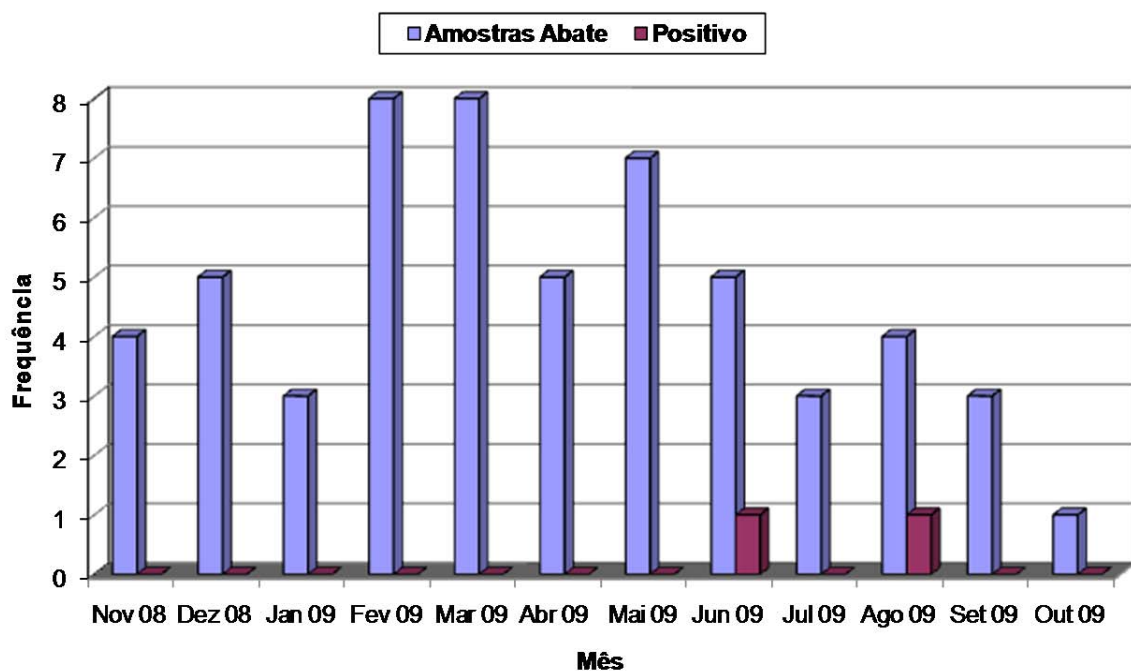


Figura 12. Resultados mensais da pesquisa da ocorrência de *Listeria* nas amostras do setor de abate.

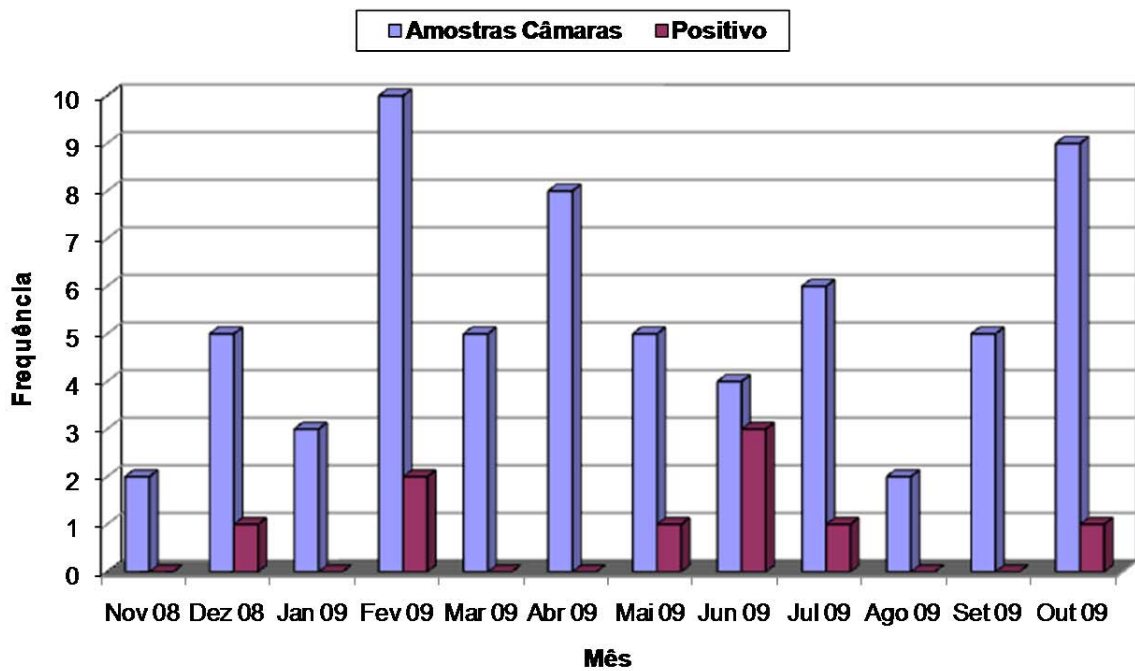


Figura 13. Resultados mensais da pesquisa da ocorrência de *Listeria* nas amostras do setor de câmaras.

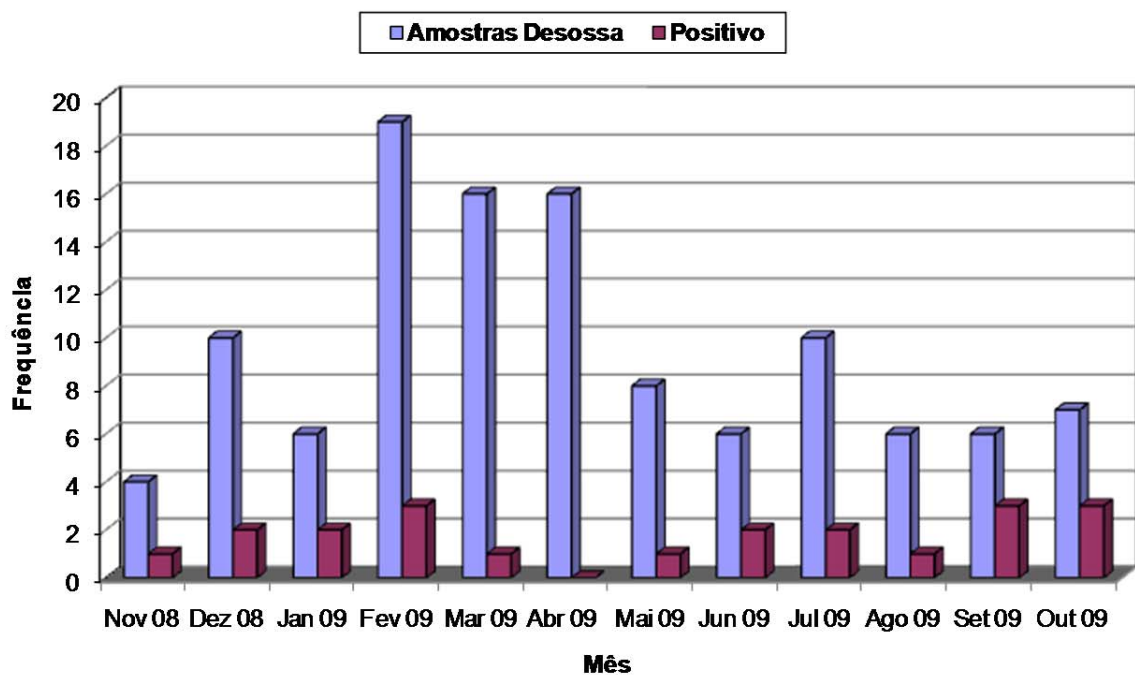


Figura 14. Resultados mensais da pesquisa da ocorrência de *Listeria* nas amostras do setor de desossa.

Conforme demonstrado na Figura 14, com exceção do mês de abril, em todos os demais meses foi detectada a presença de *Listeria* spp. em pelo menos uma amostra no setor de desossa,. Constatou-se 18,4% (21) de amostras positivas, em um total de 114 amostras, sendo o segundo setor mais problemático dentro do matadouro-frigorífico.

Para o setor de conserva, foram colhidas 55 amostras. Dessas, 8 (14,5%) foram positivas para *Listeria* spp. Nota-se, na Figura 15, ausência de coleta nos meses de maio e outubro e positividade entre os meses de dezembro e fevereiro, abril, julho e setembro.

O setor de cortes apresentou-se como o mais preocupante no matadouro-frigorífico de estudo (Fig. 16). Com 10 (18,9%) amostras positivas para *Listeria* spp., dentre as 53 analisadas, as mesmas ficaram concentradas entre os meses de novembro e janeiro e entre maio e julho. MARZOCCA et al. (2004) isolaram *L. monocytogenes* em valor bem inferior a este (6,7%) na sala de cortes, em um frigorífico na Argentina.

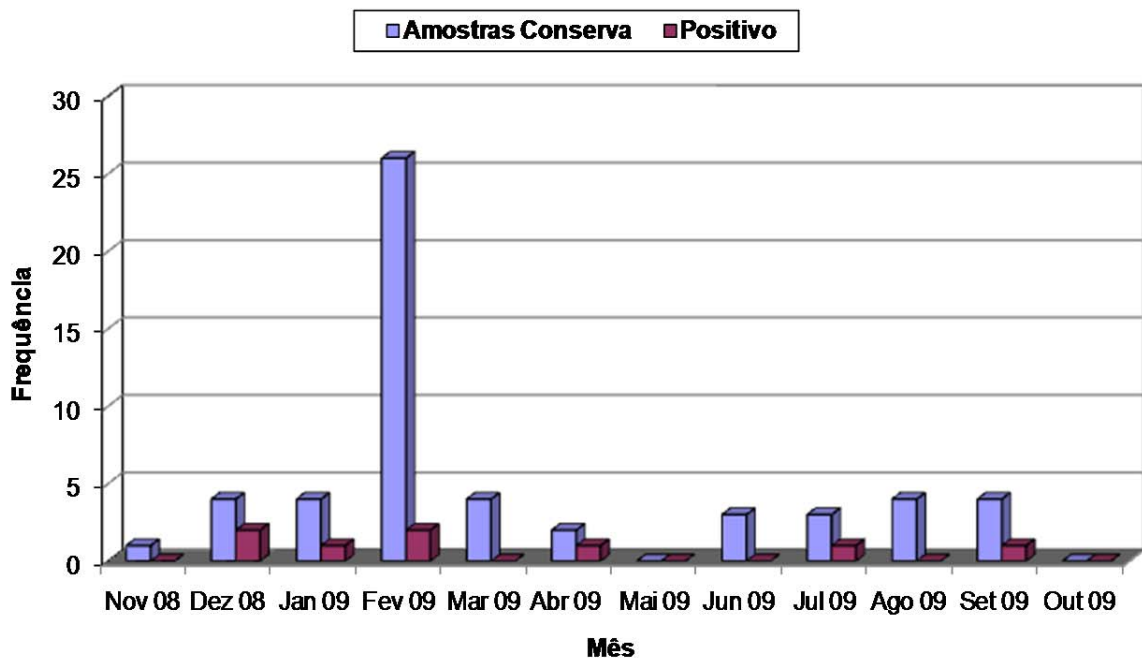


Figura 15. Resultados mensais da pesquisa da ocorrência de *Listeria* nas amostras do setor de conserva.

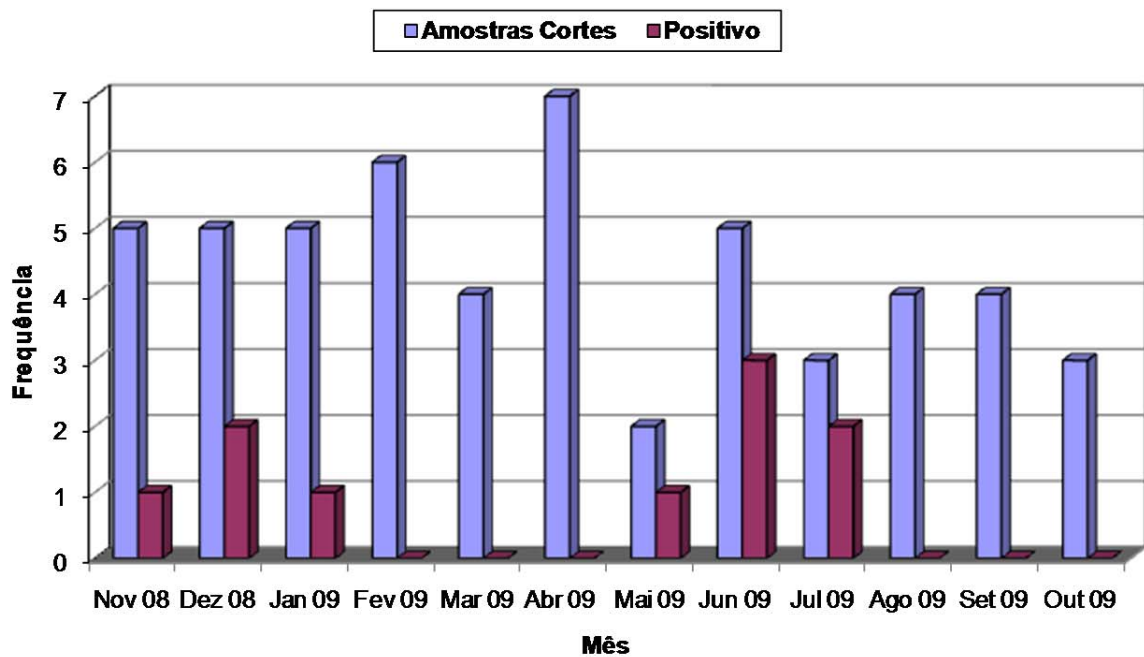


Figura 16. Resultados mensais da pesquisa da ocorrência de *Listeria* nas amostras do setor de cortes.

Tabela 5. Resultados das análises de amostras ambientais para a presença de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*, nas diferentes superfícies do estabelecimento de abate. Barretos-SP, 2010.

Superfície	Negativa	%	<i>Listeria</i> spp.	%	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	%	Total
Evaporador	69	93,2	5	6,8	2	2,7	74
Piso	132	81,5	30	18,5	8	4,9	162
Ralo	115	83,9	22	16,1	8	5,8	137
Outros	33	86,8	5	13,2	3	7,9	38
Total	349	84,9	62	15,1	21	5,1	411

Na Tabela 5 encontram-se os resultados das análises de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*, nas diferentes superfícies do frigorífico. Não existe evidências suficientes para rejeitar a hipótese de independência entre a presença/ausência de *Listeria* spp. em relação às superfícies ($p=0,1266$), entretanto o piso demonstrou ser a mais problemática, com 30 (18,5%) amostras positivas para *Listeria* spp., sendo 8 para *L. monocytogenes*, e em segundo lugar, o ralo, com 22 amostras positivas para *Listeria* spp e mesmo valor para *L.monocytogenes* (8).

PECCIO et al. (2003), ao analisarem amostras de superfícies de ambiente e equipamentos, detectaram *L. monocytogenes* em 6,5% delas, todas elas de faca, sendo uma presente mesmo após a higienização, o que demonstrou sua persistência no ambiente de abate. Neste trabalho, não foram amostradas superfícies de faca, entretanto este valor é útil para comparar com o da presente pesquisa (5,1%), que sendo muito próximo ao observado é possível também sugerir sua permanência na rotina do frigorífico estudado, uma vez que todas as amostras foram colhidas após o processo de higienização.

5.2 Controles Higiênicos na obtenção das Carcaças

- *E. coli*

A estimativa da contagem de coliforme termotolerante, especificamente *E. coli*, foi realizada num total de 675 carcaças resfriadas, com média de 56,3 análises por mês. A população média de *E. coli* encontrada foi de $0,21 \pm 0,51 \log_{10}$ UFC/cm², variando de 0 a $1,81 \log_{10}$ UFC/cm², com uma ocorrência de 147 (0,22%) amostras positivas. Pela Tabela 6, observa-se que 605 (89,6%) amostras foram classificadas como satisfatórias segundo a “Food Standards Agency” (FSA, 2010), 19 (2,8%) como aceitáveis e 51 (7,6%) como insatisfatórias, com diferença estatística entre os meses ($p<0,0001$).

A Figura 17 ilustra esses dados. Constata-se que os resultados insatisfatórios ficaram concentrados aos meses mais quentes e úmidos do ano, de novembro a março,

com excessão para os meses de julho e outubro, com 1 amostra fora dos padrões em cada um deles. Contrariamente e diferindo estatisticamente ($p < 0,0001$), os resultados aceitáveis concentraram-se entre junho e outubro, período em que as temperaturas são mais amenas e o tempo mais seco, exceto para o mês de dezembro, que apresentou 2 amostras aceitáveis. Em todo o período foram encontradas amostras satisfatórias, variando de 31 a 68 por mês. No período chuvoso, foram observados 228 (81,7%) resultados satisfatórios, 2 (0,7%) aceitáveis e 49 (17,6%) insatisfatórios, com média de $0,38 \pm 0,68 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$, enquanto que na período seco, 377 (95,2%) foram classificados como satisfatórios, 17 (4,3%) como aceitáveis e 2 (0,5%) insatisfatórios e média de $0,10 \pm 0,28 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ (Figura 18).

Critério menos rigoroso é adotado pela Comissão Européia (CE, 2005) para a classificação das estimativas, tanto de CT, quanto de *E. coli* em carcaças de bovinos. Médias logarítmicas menores ou iguais a $1,5 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ são consideradas satisfatórias; entre $1,5$ e $2,5 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$, aceitáveis; e maiores que $2,5 \log_{10}$ como insatisfatórias.

Baseado nisso, os resultados das estimativas de *E. coli* foram reclassificados segundo a Comissão Européia (CE, 2005). Das 675 amostras de carcaça resfriada, 625 (92,4%) foram classificadas como satisfatórias e apenas 51 (7,6%) como aceitáveis, com diferenças estatísticas entre os meses do ano ($p < 0,0001$). Devido à elasticidade da faixa de resultados aceitáveis, nenhuma amostra insatisfatória foi detectada.

Tabela 6. Resultados das análises de *E. coli* em carcaças refrigeradas de novembro de 2008 a outubro de 2009, segundo critérios internacionais estabelecidos pela “Food Standards Agency” – UK, 2005. Barretos-SP, 2010.

Mês/Ano	Satisfatória	Aceitável	Insatisfatória	Total
Nov 08	34	0	2	36
Dez 08	57	2	5	64
Jan 09	40	0	12	52
Fev 09	37	0	22	59
Mar 09	60	0	8	68
Abr 09	45	0	0	45
Mai 09	31	0	0	31
Jun 09	68	1	0	69
Jul 09	56	3	1	60
Ago 09	60	7	0	67
Set 09	64	3	0	67
Out 09	53	3	1	57
Total	605	19	51	675

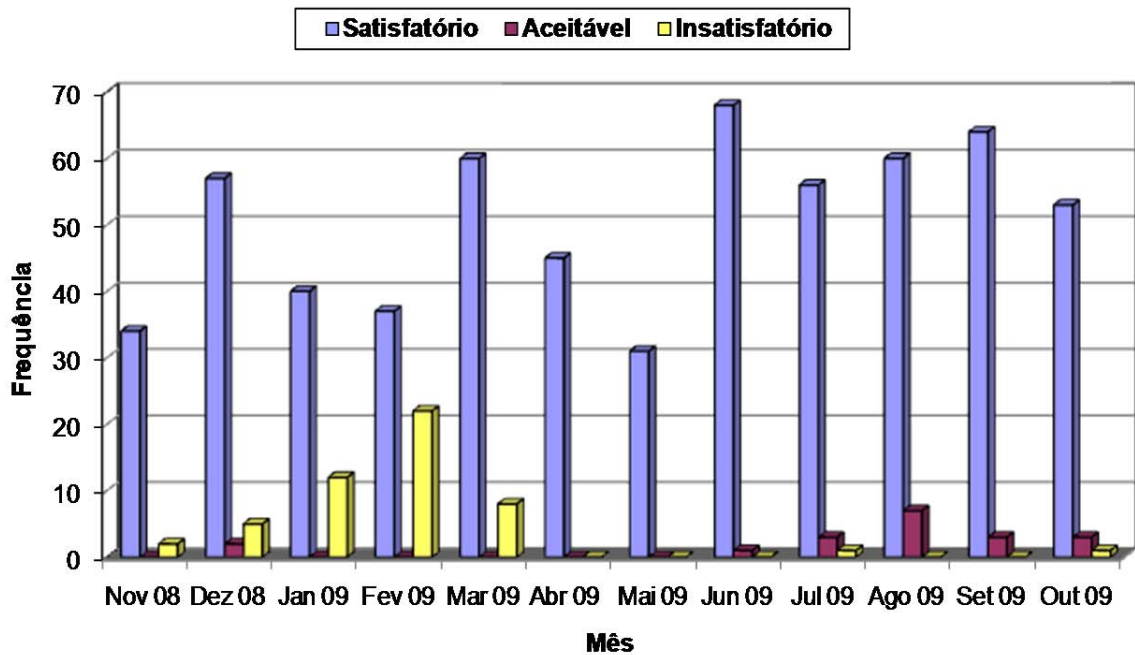


Figura 17. Resultados mensais da estimativa de *E. coli* em superfície de carcaças resfriadas de acordo com o padrão de interpretação, para o período de um ano.

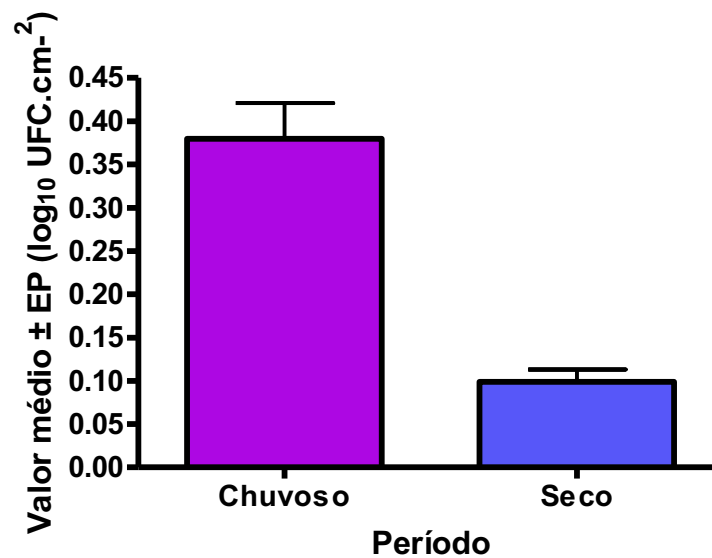


Figura 18. Resultados da estimativa de *E. coli* em superfície de carcaças resfriadas de acordo com os períodos do ano (chuvoso e seco) (EP: Erro Padrão).

Valor semelhante foi observado por RIGOBELLO et al. (2006) no Brasil, ao colherem suabes de carcaças bovinas para a pesquisa de *E. coli* na pós e pré-evisceração e no pós-processamento, durante os períodos chuvoso e seco. A prevalência de *E. coli* nestes três pontos foi de 30%, 70% e 27,5% na época das chuvas, sendo mais elevada que na época da seca, com 22,5%, 55% e 17,5% de positividade.

SUMNER et al. (2003) avaliaram 95 carcaças bovinas resfriadas em abatedouros de pequeno porte, confirmando a baixa contagem de *E. coli* encontrada, com média de $-0,33 \log_{10}$ UFC/200cm². As operações de esfola foram consideradas fontes primárias de contaminação fecal de carcaças bovinas no estudo de TERGNEY & BOLTON (2006). As contagens de *E. coli* foram relativamente baixas, diminuindo por cerca de 6 meses, de $-0,14 \log_{10}$ UFC/cm² para $-0,7 \log_{10}$ UFC/cm². Segundo os autores, essa diminuição representou um risco de segurança alimentar reduzido, uma vez que estes grupos incluem sérios patógenos, como *Salmonella* e *E. coli* O157:H7.

Ao obterem valores médios de contagem de *E. coli* no couro bovino variando entre $0,86 \log_{10}$ UFC/cm² (pastagem) e $0,64 \log_{10}$ UFC/cm² (confinamento) e na superfície de carcaças bovinas após a lavagem, variando entre 0,42 (pastagem) e $0,40 \log_{10}$ UFC/cm² (confinamento), JARDIM et al. (2006) concluíram que, de modo geral, os procedimentos adotados para garantir uma esfola higiênica, com um mínimo de oportunidades de contato entre couro e carcaça, foram aplicados na planta de abate em estudo, minimizando as contaminações nas superfícies das carcaças bovinas. O mesmo pode-se concluir no presente trabalho, uma vez que a população média de *E. coli* encontrada foi menor daquela apresentada por estes autores.

- **Amostragem Comparativa**

Os resultados obtidos nas estimativas da CBT, de Coliformes Totais, de *E. coli*, de *E. coli* O157:H7 e de *Salmonella* spp. nas terminações a pasto e confinada estão registrados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados de diferentes métodos de análise de acordo com critérios internacionais estabelecidos pela “Food Standards Agency” – UK, 2005. Barretos-SP, 2010.

Análises	Terminação a Pasto		Terminação Confinada	
	Nº. de Amostras	Resultado %	Nº. de Amostras	Resultado %
CBT	114	100	86	100
Satisfatória	98	86,0	79	91,9
Aceitável	16	14,0	7	8,1
Insatisfatória	0	0,0	0	0,0
Coliformes Totais	50	100	50	100
Satisfatória	45	90,0	39	78,0
Aceitável	5	10,0	6	12,0
Insatisfatória	0	0,0	5	10,0
<i>E. coli</i>	149	100	162	100
Satisfatória	122	81,9	138	85,2
Aceitável	1	0,7	3	1,8
Insatisfatória	26	17,4	21	13
<i>E. coli</i> O157:H7	50	Ausência	50	Ausência
<i>Salmonella spp.</i>	196	Ausência	68	Ausência

Para CBT foram analisadas ao todo 200 amostras de carcaça quente. Das 114 amostras provenientes de terminação a pasto, 98 (86%) apresentaram-se satisfatórias e 16 (14%) aceitáveis. Em relação à terminação confinada, foram amostradas 86 carcaças, sendo 79 (91,9%) satisfatórias e 7 (8,14%) aceitáveis (Figura 19).

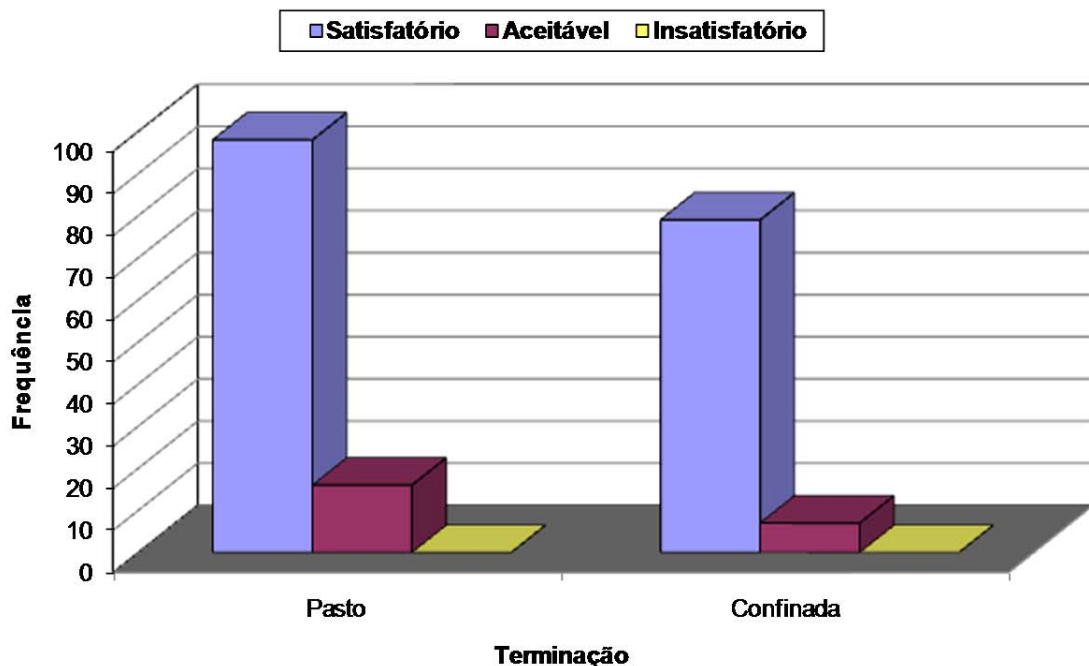


Figura 19. Distribuição dos resultados da CBT das amostras de superfície das carcaças quentes, respectivamente para animais de terminação a pasto e de terminação confinada.

Embora não haja diferenças significativas ($p=0,4583$) entre os dois grupos de acordo com a “Food Standards Agency”, a terminação confinada apresentou resultados satisfatórios ligeiramente superiores, quando comparado às amostras de bovinos criados a pasto. No entanto, para as estimativas da CBT, observou-se diferenças significativas ($p<0,0001$) entre as terminações. A população média de microrganismos viáveis encontrada foi de $1,67 \pm 0,65 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ para a terminação a pasto e $1,28 \pm 0,63 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ para a terminação confinada, variando de 0,40 a $3,18 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ e de 0,18 a $2,80 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ em carcaças de bovinos criados a pasto e em confinamento, respectivamente.

JARDIM et al. (2006), ao avaliarem a contaminação microbiana do couro e da superfície de carcaças bovinas, provenientes de sistema extensivo e intensivo no Brasil, observaram que os resultados das CBT nas amostras de bovinos em pastagem foram superiores em todas as operações de abate (antes da esfolagem, após a esfolagem e após a

lavagem), em relação às amostras de bovinos em confinamento, com diferença entre as médias estatisticamente significantes. Após a esfola, valores médios de $1,89 \log_{10}$ UFC/cm² nas amostras de bovinos terminados a pasto e de $1,78 \log_{10}$ UFC/cm² nas de terminados em confinamento foram discretamente superiores às encontradas no presente estudo; no trabalho desenvolvido por SUMNER et al. (2003) em abatedouros pela técnica de Petrifilm ($1,72 \log_{10}$ UFC/cm²) e nos valores encontrados por PEARCE & BOLTON (2005), cujas médias variaram entre $1,80 \log_{10}$ UFC/cm² e $1,90 \log_{10}$ UFC/cm², para suabe de acetato de celulose e de poliuretano, respectivamente.

Outros relatos na literatura demonstram médias dos resultados semelhantes aos verificados neste experimento, como no trabalho realizado por HUTCHISON et al. (2005) por meio da técnica de suabe, com valor médio para CBT de $1,40 \log_{10}$ UFC/cm² e por GILL & BADONI (2010), que após conduzirem uma pesquisa no Canadá, com 25 carcaças bovinas amostradas por pessoas com e sem experiência, observaram valores médios de microrganismos viáveis variando de $1,20$ a $1,60 \log_{10}$ UFC/cm².

GILL et al. (1998) apresentaram resultados bem superiores aos encontrados no presente estudo em abatedouros após a lavagem das carcaças, com valores médios para contagem de microrganismos viáveis variando entre $2,78$ e $3,70 \log_{10}$ UFC/cm². Resultados semelhantes foram verificados por GHAFIR et al (2008), com médias variando entre $2,88$ e $3,19 \log_{10}$ UFC/cm²; por MARTÍNEZ et al. (2009), revelando níveis de contagem total de microrganismos viáveis entre $3,10$ e $4 \log_{10}$ UFC/cm² na maioria das carcaças obtidas por suabe e por MARTÍNEZ et al. (2010), cujo valor médio obtido foi de $3,91 \log_{10}$ UFC/cm² em carcaças quentes.

Em seu trabalho, FRANÇA FILHO (2005) concluiu que a qualidade bacteriológica das meias-carcaças bovinas amostradas revelou-se aceitável, tendo em vista os baixos níveis de contaminação encontrados, apresentando o valor de $5,5 \times 10^4$ UFC/cm², ou seja, $4,74 \log_{10}$ UFC/cm², como máximo de CBT.

Tendo em vista a utilização de critérios rigorosos, preconizados pela “Food Standadrs Agency” (FSA, 2010) do Reino Unido, nenhuma amostra deste estudo excedeu o limite de $2,0 \times 10^4$ UFC/cm² nas carcaças pesquisadas, não havendo, portanto, amostras classificadas como insatisfatórias. Isso se deve, principalmente, à

elasticidade da faixa de classificação do nível aceitável, a qual varia desde $6,31 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^4$ UFC/cm² (2,8 a 4,3 log₁₀). Assim, apesar da grande variação nas estimativas dentro do grupo de bovinos terminados a pasto e em confinamento descrita anteriormente, afirma-se que as amostras foram obtidas em melhores condições higiênicas que nos demais trabalhos, pela execução adequada de controles operacionais e das boas práticas de fabricação.

Quando as amostras de carcaça resfriada foram submetidas à contagem de CT, os resultados variaram de 0 a 1,26 log₁₀ UFC/cm² em bovinos terminados a pasto, e de 0 a 1,88 log₁₀ UFC/cm² para bovinos terminados em confinamento, com médias de $0,13 \pm 0,31$ log₁₀ e $0,39 \pm 0,59$ log₁₀ UFC/cm², respectivamente, e diferença estatística entre as terminações ($p=0,0197$). Para a contagem de *E. coli*, ocorreu numericamente o inverso, com valores médios maiores em animais terminados a pasto ($0,38 \pm 0,68$ log₁₀ UFC/cm²), quando comparados àqueles terminados em confinamento ($0,31 \pm 0,61$ log₁₀ UFC/cm²), entretanto, sem diferença estatística ($p=0,8989$). Em ambos os sistemas de engorda, a variação foi de 0 a 1,81 log₁₀ UFC/cm².

FEGAN et al. (2004a), igualmente, não observaram diferenças significativas entre as terminações, quando submeteram amostras fecais à contagem de *E. coli* em Petrifilm ($p=0,95$), com médias de $5,4$ log₁₀ UFC/g⁻¹ e $5,7$ log₁₀ UFC/g⁻¹, para animais terminados a pasto e em confinamento, respectivamente. No Brasil, JARDIM et al. (2006) observaram que as contagens médias de CT e *E. coli*, obtidas nas amostras de carcaças de bovinos em pastagem ($1,27$ log₁₀ UFC/cm² antes da esfolagem e $0,55$ log₁₀ UFC/cm² após a lavagem para CT; $0,86$ log₁₀ UFC/cm² antes da esfolagem e $0,42$ log₁₀ UFC/cm² após a lavagem para *E. coli*) foram superiores em todas as operações de abate, em relação àquelas obtidas nas amostras de bovinos em confinamento ($0,65$ log₁₀ UFC/cm² antes da esfolagem e $0,41$ log₁₀ UFC/cm² após a lavagem para CT; $0,64$ log₁₀ UFC/cm² antes da esfolagem e $0,40$ log₁₀ UFC/cm² após a lavagem para *E. coli*), com exceção da etapa após a esfolagem ($0,40$ log₁₀ UFC/cm² para ambas as análises e terminações), onde foi detectada ausência nos dois grupos de amostras, indicando pequeno contato entre couro/carcaça e, portanto, baixa ocorrência de contaminações cruzadas envolvendo operadores, equipamentos e utensílios. Apenas a etapa antes da

esfola apresentou diferença significativa entre os sistemas de engorda, sendo esta somente para CT. Estes resultados concordam com os do presente estudo para análise de *E. coli*, no entanto, para contagem de CT, foram contrários.

Resultados muito semelhantes para a contagem de *E. coli* também foram detectados em frigoríficos irlandeses por McEVOY et al. (2004), que ao examinarem a contaminação microbiológica de carcaças bovinas nas principais operações do processo de abate, encontraram níveis variando entre 0 e 1,95 \log_{10} UFC/cm², após a refrigeração. Entretanto, os valores encontrados na contagem de CT, de 2,44 a 3,12 \log_{10} UFC/cm², foram bem superiores aos do presente experimento. Segundo os autores, o uso de indicadores fecais auxilia na detecção de falhas no controle do processo durante a evisceração e serragem das carcaças, particularmente na região posterior, com aumentos importantes de CBT.

Segundo GILL et al. (1998), contagens de CT e *E. coli* podem ser usados na identificação objetiva de pontos críticos de controle para a segurança e/ou qualidade geral de higiene, bem como para a verificação de procedimentos de controle. Ao avaliarem carcaças de novilhos, imediatamente antes do resfriamento, os autores obtiveram populações médias para CT e *E. coli* entre 1,39 e 2,51 \log_{10} UFC/100cm² e entre 0,75 e 1,74 \log_{10} UFC/100cm², respectivamente. GILL & BADONI (2010) analisaram 25 amostras de carcaça bovina colhidas em um frigorífico de pequeno porte. Para análise de CT as médias variaram de 1,33 a 2,02 \log_{10} UFC/cm² e para *E. coli*, de 1,07 a 1,47 \log_{10} UFC/cm². O presente estudo apresentou bons resultados, quando comparados aos citados, com populações de CT e *E. coli* em níveis inferiores, o que permite afirmar, novamente, que as boas práticas de fabricação foram realizadas adequadamente durante todo o processo de abate.

De acordo com os critérios da “Food Standards Agency”, Reino Unido (FSA, 2010), 45 (90%) e 39 (78%) amostras foram consideradas satisfatórias para contagem de CT; 5 (10%) e 6 (12%) aceitáveis, para bovinos terminados a pasto e em confinamento, respectivamente. Amostras insatisfatórias somente foram detectadas em animais confinados, totalizando 10% (5), não havendo diferença estatística entre as terminações ($p=0,0633$) (Figura 20).

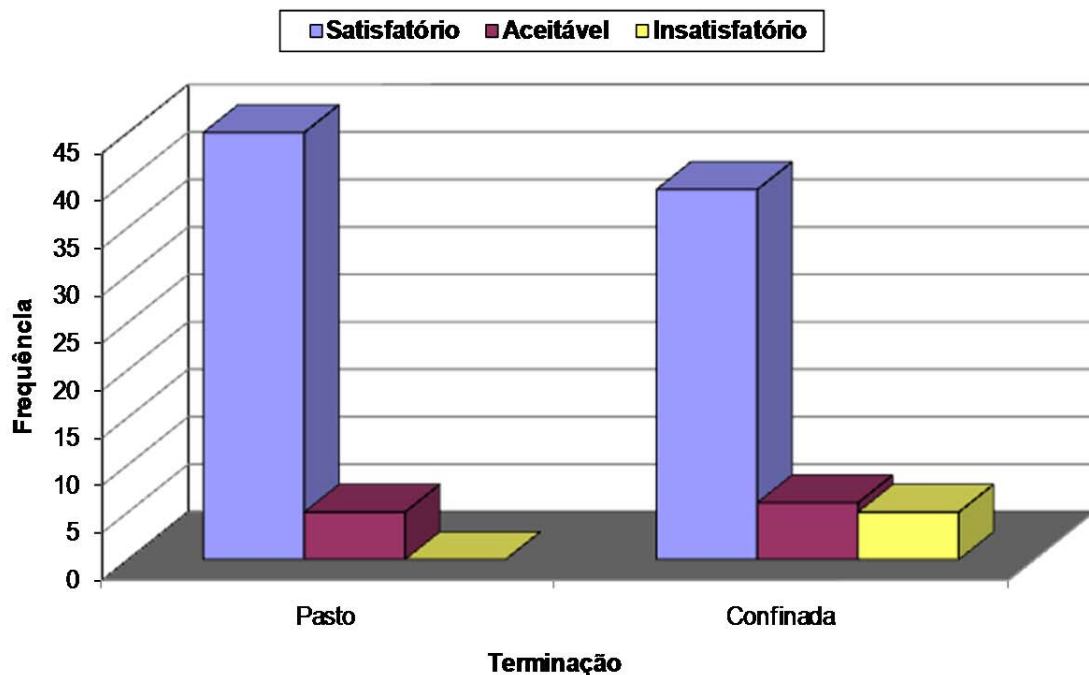


Figura 20. Distribuição dos resultados da estimativa de Coliformes Totais das amostras de superfície das carcaças resfriadas, respectivamente para animais de terminação a pasto e de terminação confinada.

A Figura 21 ilustra os dados da Tabela 7, para estimativa de *E. coli* em carcaças resfriadas. Os resultados da contagem de *E. coli* foram classificados como satisfatórios em 122 (81,9%) amostras, aceitável em 1 (0,7%) amostra e insatisfatórios em 26 (17,4%) amostras de bovinos terminados a pasto. Resultados semelhantes e sem diferenças significativas ($p=0,3722$) foram descritos para terminação confinada, onde 138 (85,2%) amostras foram consideradas satisfatórias, 3 (1,8%) aceitáveis e 21 (13%) insatisfatórias.

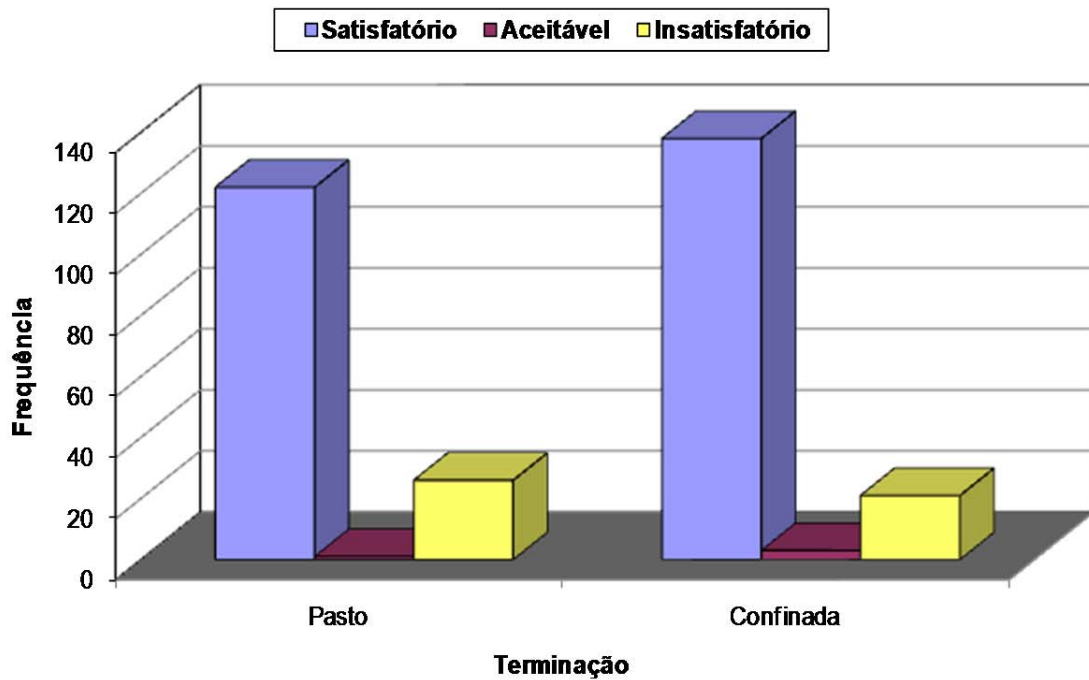


Figura 21. Distribuição dos resultados da estimativa de *E. coli* em amostras de superfície das carcaças resfriadas, respectivamente para animais de terminação a pasto e de terminação confinada.

Segundo os padrões adotados pela Comissão Europeia (CE, 2005), 100% (50) das amostras de bovinos terminados a pasto foram classificadas como satisfatórias para CT; 46 (92%) e 4 (8%) amostras foram classificadas como satisfatórias e aceitáveis, respectivamente, para bovinos terminados em confinamento, apresentando diferenças significativas entre os sistemas de engorda ($p=0,0218$). Esta diferença contradiz a classificação de acordo com a “Food Standards Agency”, provavelmente pela faixa de resultados satisfatórios, segundo a Comissão Europeia, ser mais ampla ($\leq 1,5 \log_{10}$ UFC/cm²). Quanto aos resultados de *E. coli*, amostras satisfatórias foram encontradas em 123 (82,6%) carcaças de animais criados a pasto e em 141 (87%) de animais criados em confinamento. Amostras aceitáveis foram detectadas em 17,4% (26) das amostras de bovinos terminados a pasto e em 13% (21) de bovinos terminados em confinamento, com ausência de diferença estatística entre os grupos ($p=0,2698$).

A escolha do método Petrifilm para a análise de amostras de superfícies de carcaças, bem como a utilização de suabe de celulose na colheita das mesmas, mostraram-se prático e eficiente. O Petrifilm EC já demonstrou ser mais sensível na detecção de *E. coli* em relação ao método de tubos múltiplos no trabalho desenvolvido por SILVA et al. (2006), principalmente para amostras de alimentos de origem animal. Somado a isso, o Regulamento nº 471/2001 da Comissão Européia (EC, 2001), que oferece a possibilidade de utilização do método não-destrutivo, como alternativa ao destrutivo na avaliação bacteriológica de carcaças, simplificou o trabalho, podendo reduzir os custos.

Com relação aos dados da Tabela 7, dentre as 100 amostras de carcaça resfriada estudadas, 50 de cada terminação, em nenhuma delas foi encontrado *E. coli* O157:H7. O mesmo resultado foi obtido para análise de *Salmonella* spp., sendo 196 amostras de animais criados a pasto e 68 de animais criados em confinamento. Estes resultados condizem com os encontrados nas estimativas de CBT, CT e *E. coli*, considerados satisfatórios em 88,5%, 84% e 83,6%, respectivamente.

O rebanho brasileiro é predominantemente de bovinos criados a pasto. A alimentação baseada em fibras por ter fermentação mais lenta, pode ser substituída favoravelmente por grãos de cereais. Entretanto, estudos mostram que uma dieta rica em grãos pode favorecer a multiplicação de *E. coli* ácido-resistentes, como a *E. coli* O157:H7, em consequência da diminuição do pH ruminal, contaminando o ambiente. Práticas inadequadas de manejo somadas ao adensamento populacional, favorecem ainda mais essa condição. Por outro lado, animais alimentados em pastagens, podem tornar-se mais susceptíveis à contaminação, principalmente em relação ao couro, sendo eventuais fontes de contaminação as gramíneas, humanos, águas, fezes, solo e esgotos (JARDIM et al., 2006).

FEGAN et al. (2004a) determinaram a prevalência e concentração de *E. coli* O157 nas fezes de bovinos de diferentes sistemas de produção em abatedouros. A *E. coli* O157 foi isolada por meio da separação imunomagnética automatizada (“AIMS”) em 13% das amostras fecais, com ausência de diferença significativa entre animais terminados a pasto (10%) e em confinamento (15%). MASANA et al. (2010) também

não relataram diferença estatística entre os sistemas de engorda, detectando 4,1% de amostras fecais positivas para STEC O157 em bovinos criados em pastagem e 3,3% em confinamento.

Resultado idêntico ao deste experimento foi apresentado em abatedouros aprovados pela Comunidade Européia. Pelo método da excisão, das 780 carcaças resfriadas amostradas, nenhuma foi positiva para *E. coli* O157:H7 (MADDEN et al., 2001). Prevalências próximas foram descritas na literatura por alguns pesquisadores. MEICHTRI et al. (2004), ao amostrarem fezes de novilhos saudáveis na Argentina, isolaram em apenas uma *E. coli* O157:H7 (0,5%). Segundo os autores, a ausência de uma etapa de concentração das amostras e a eliminação intermitente e de curta duração da *E. coli* O157:H7, podem explicar tal resultado. RIGOBELLO et al. (2006), pesquisando carcaças de bovinos confinados no Brasil, encontraram somente uma amostra positiva para STEC (1,2%), relatando altos níveis de resistência a múltiplas drogas em suas amostras, capazes de causarem esta baixa frequência.

E. coli O157 foi isolada em 39 (2,6%) das 1.503 amostras de carcaça na pré-evisceração em 15 (30%) caminhões de transporte, na época do verão (FOX et al., 2008). MASANA et al. (2010) estimaram a prevalência de STEC O157 em 1.622 amostras de carcaças bovinas quentes em frigoríficos habilitados à exportação, sendo esta também de 2,6%. McEVOY et al. (2003b), ao investigarem a prevalência e características de virulência da *E. coli* O157:H7 após determinadas operações de abate em um frigorífico, revelaram que 3,2% das carcaças bovinas estavam contaminadas por esta bactéria.

BRICHTA-HARHAY et al. (2008) encontraram prevalências de 46,9% e 16,7% em couros e carcaças na pré-evisceração, respectivamente, não sendo afetadas significativamente pelos períodos chuvoso e seco e apresentando diferenças significativas entre plantas, na transferência de patógenos do couro para a carcaça. EHEC O157 foi recuperada de quase a metade (45,5%) das carcaças bovinas testadas no estudo de ELDER et al. (2000), particularmente na parte posterior da carcaça (43% na pré-evisceração). A alta prevalência encontrada pôde ser explicada, presumivelmente, pela metodologia de cultura e locais de amostragem empregados,

apesar do experimento ter sido conduzido durante a época de pico de eliminação de EHEC O157 na América do Norte. Ainda, a redução da prevalência em carcaças da pré-evisceração (43%) para a pós-evisceração (2%) sugeriu que os procedimentos sanitários foram efetivos. CHAPMAN et al. (1993), ao investigarem *E. coli* O157 em suabes de superfícies de carcaças bovinas, relataram positividade em 30% e 2% das carcaças com suabes fecais positivos e negativos, respectivamente.

A *Salmonella*, outro importante patógeno da cadeia produtiva da carne, foi pesquisada por FEGAN et al. (2004b) para determinar sua prevalência e números em bovinos de corte abatidos na Austrália. *Salmonella* spp. foi isolada em apenas 6,8% das fezes dos animais, sendo a prevalência em bovinos terminados a pasto (4,5%) não significativamente diferente daquela encontrada em bovinos terminados em confinamento (9%), sugerindo o baixo risco de contaminação de carcaças. MADDEN et al. (2001), analisando 200 carcaças bovinas, obtiveram somente três amostras positivas (1,5%), duas para *S. Mbandaka* e uma para *S. Thompson*. BRICHTA-HARHAY et al. (2008), ao examinarem a higiene do couro e de carcaças bovinas em abatedouros de quatro regiões distantes dos Estados Unidos, constataram 0,8% como prevalência média de *Salmonella* na pós-intervenção de carcaças, sem diferença significativa entre os períodos chuvoso e seco, resultado este muito próximo da presente pesquisa (0%).

Em abatedouros comerciais da Irlanda, McEVOY et al. (2003a), isolaram *Salmonella* em 2% das amostras fecais e 7,6% dos suabes de carcaças de bovinos, sendo mais relatada entre agosto e outubro. A alta prevalência em carcaças foi sugerida ser resultado de diferentes técnicas e regimes de amostragem, diferenças na higiene das operações de esfolagem e evisceração ou variações geográficas na incidência de *Salmonella*. VO et al. (2006) confirmaram a presença de *Salmonella* em 27,4% das 390 amostras provenientes de fezes, carcaças e carne de bovinos, sendo 16 carcaças positivas. A fim de suprir dados referentes à prevalência de *Salmonella* em frigoríficos de pequeno porte, BOSILEVAC et al. (2009) obtiveram 57,8% de carcaças bovinas positivas das 1.995 pesquisadas na pré-evisceração, com 8% delas a um nível enumerado ($>0,5$ UFC/100cm²) e relação direta com a prevalência no couro.

Valores bem superiores ao descrito neste estudo, tanto para *E. coli* O157:H7 quanto para *Salmonella*, foram referenciados em vários trabalhos, no entanto, as diferenças climáticas, de amostragem e de processamento das amostras, podem ter influenciado negativamente estes resultados. Por outro lado, todos os procedimentos que visam garantir melhores condições higiênico-sanitárias do abate foram realizadas no frigorífico de estudo, proporcionando assim, qualidade adequada às carcaças, o que permite sugerir a baixa ocorrência de ambos os patógenos no Brasil.

- **Recortes cárneos**

Apenas 1 (0,31%) das 323 amostras de recortes cárneos foi positiva para pesquisa de *E. coli* O157:H7. Valor bem semelhante foi relatado por KENNEDY et al. (2006) nos Estados Unidos, que ao analisarem 1.199 amostras de cortes cárneos bovinos de segunda, não detectaram a presença de *E. coli* O157:H7 (<0,083%) em nenhuma delas. Ainda nos Estados Unidos, STOPFORTH et al. (2006) relataram taxa de incidência média de *E. coli* O157:H7 de 0,3% em amostras de cortes de carne bovina *in natura*, a qual foi isolada exclusivamente de cortes derivados da área do lombo, sugerindo que a contaminação em cortes cárneos pode ser influenciada pela região da carcaça de onde eles são derivados.

VI. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

- As estimativas de CBT em superfícies de contato com alimentos evidenciaram alto percentual de amostras consideradas fora dos padrões higiênicos aceitáveis, indicando a necessidade da aplicação de ações corretivas. As situações mais problemáticas foram verificadas no setor de abate, durante o período chuvoso e para a superfície de aventais, todas essas com quantidades superiores de resultados não aceitáveis.
- Um número elevado de amostras ambientais foi positiva para as pesquisas de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*. O setor de cortes e a superfície do piso revelaram-se os de maior incidência. Não foram encontradas diferenças significativas entre os períodos do ano e superfícies amostradas, demonstrando relativa persistência desses microrganismos no ambiente de abate.
- As estimativas de *E. coli* em amostras de carcaças resfriadas apresentaram-se em grande parte satisfatórias, sendo que os resultados insatisfatórios ficaram mais concentrados no período chuvoso. Quando se comparou a estimativa de *E. coli* entre as terminações, foram observadas maiores contagens e resultados insatisfatórios na terminação a pasto.
- Não foram constatados resultados insatisfatórios nas estimativas de CBT em amostras de carcaças quentes, com maiores contagens presentes nos bovinos terminados a pasto.

- As contagens de CT demonstraram serem maiores nas carcaças de bovinos terminados em confinamento, com resultados insatisfatórios somente no sistema de engorda intensivo.
- A ausência de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. em amostras de carcaças resfriadas e a baixa ocorrência de *E. coli* O157:H7 em amostras de recortes cárneos associadas aos elevados índices de valores satisfatórios nas estimativas de CBT, CT e *E. coli*, permitem concluir favoravelmente à eficácia dos controles higiênico-sanitários durante as operações de abate, do modo que vêm sendo praticados dentro do programa APPCC, impedindo que importantes patógenos atinjam as superfícies das carcaças.

VII. REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Sanidade animal**. Disponível em: < http://www.abiec.com.br/3_sanidade.asp>. Acesso em: 8 dez. 2009.

APHA. American Public Health Association. **Methods for the examination of dairy products**. Washington, 1992. 546 p.

ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; NOU, X.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KENT, M. P.; JARONI, D.; PAULING, B.; ALLEN, D. M.; KOOHMARAIE, M. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 4, p. 658-665, 2004.

ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; KALCHAYANAND, N.; KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Source tracking of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* contamination in the lairage environment at commercial U.S. beef processing plants and identification of an effective intervention. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 9, p. 1752-1760, 2008.

BAALE, M. J. V.; SARGEANT, J. M.; GNAD, D. P.; DEBEY, B. M.; LECHTENBERG, K. F.; NAGARAJA, T. G. Effect of forage or grain diets with or without monensin on ruminal persistence and fecal *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 9, p. 5336-5342, 2004.

BARRETO, E. S. S. **Listeriose** (por: Saúde-Rio). 2001. Disponível em: <<http://www.saude.rio.rj.gov.br/cgi/public/cgilua.exe/web/templates/htm/v2/printerview.htm?editionsectionid=2&infoid=25&user=reader>>. Acesso em: 6 jan. 2010.

BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; MANOEL, A. V. B.; DOVÍDIO, L.; SILVA, L. C.; FRANCO, B. D. G. M.; BELOTI, V. *Listeria* spp. associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 603-609, 2007.

BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis. In: WRAY, C.; DAVIES, R. H. (Ed.). **Salmonella in domestic animals**. Wallingford: CABI Pub, 2000. cap. 4, p. 57-72.

BELOTI, V.; SOUZA, J. A.; BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; GUSMÃO, V. V.; MORAES, L. B. Evaluation of PetrifilmTM EC and HS for total coliforms and *Escherichia coli* enumeration in water. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 301-304, 2003.

BENNETT, A. R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J. G.; BETTS, R. P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 437-441, 1998.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; MORA, A.; PRADO, C.; ALONSO, M. P.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C.; JUÁREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 54, n. 3-4, p. 309-319, 1997.

BOLTON, D. J.; PEARCE, R. A.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A.; HARRINGTON, D. Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 5, p. 893-902, 2002.

BONARDI, S.; MAGGI, E.; BOTTARELLI, A.; PACCIARINI, M. L.; ANSUINI, A.; VELLINI, G.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A. Isolation of verotoxin-producing *Escherichia*

coli O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 203-211, 1999.

BOSILEVAC, J. M.; ARTHUR, T. M.; BONO, J. L.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; KALCHAYANAND, N.; KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in U.S. abattoirs that process fewer than 1,000 head of cattle per day. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 6, p. 1272-1278, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular nº 272/97/DIPOA. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil**, Brasília – DF, 22 dez. 1997a. p. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual para teste de *Escherichia coli* para verificação do controle de processos em estabelecimentos de abate de bovinos e suínos. Anexo à circular nº 272/97/DIPOA. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil**, Brasília – DF, 22 dez. 1997b. p. 1, 7.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decisão 2001/471/CE. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, 8 jun. 2001. p. L165/53.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil**, Brasília – DF, 26 ago. 2003. Seção 1. p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular nº 354/2004/DCI/DIPOA. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil**, Brasília – DF, 25 jun. 2004. p. 3, 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular n° 092/2007/CGPE/DIPOA. Coordenação geral de programas especiais. **Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil**, Brasília – DF, 30 jun. 2007. p. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf>. Acesso em: 7 jan 2010.

BRICHTA-HARHAY, D. M.; GUERINI, M. N.; ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 contamination on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States: an evaluation of prevalence and bacterial loads by immunomagnetic separation and direct plating methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 20, p. 6289-6297, 2008.

BROWN, T. A. A reação em cadeia da polimerase. In:_____. **Clonagem gênica e análise de DNA**. 4. ed. Porto Alegre: Atheneu, 2003, cap. 9, p. 187-201.

BROWNLIE, L. E.; GRAU, F. H. Effect of food intake on growth and survival of salmonellas and *Escherichia coli* in the bovine rumen. **The Journal of General Microbiology**, Londres, v. 46, p. 125–134, 1967.

BUCHANAN, R. L.; DOYLE, M. P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. **Food Technology**, Van Buren, v. 51, n. 10, p. 69-76, 1997.

CAC/RCP. Codex Alimentarius Commission 1-1969, Rev. 4-2003. Recommend international code of practice general principles of food hygiene. **Hazard analysis and**

critical control point (HACCP) system and guidelines for its application. Seção 10, 2003. p. 21.

CALLAWAY, T. R.; ELDER, R. O.; KEEN, J. E.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Forage feeding to reduce pre-harvest *E. coli* populations in cattle, a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 3, p. 852–860, 2003.

CALLAWAY, T. R.; ANDERSON, R. C.; EDRINGTON, T. S.; GENOVESE, K. J.; BISCHOFF, K. M.; POOLE, T. L.; JUNG, Y. S.; HARVEY, R. B.; NISBET, D. J. What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle?. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, supl. 13, p. E93-E99, 2004.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic notes and reports listeriosis associated with consumption of turkey franks. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 38, n. 15, p. 267-268, 1989.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic notes and reports foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Escherichia coli* O157:H7 – North Dakota, 1990. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 40, n. 16, p. 265-267, 1991.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Update: foodborne listeriosis-United States, 1988-1990. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 41, n. 15, p. 257-258, 1992.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, 1992-1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 42, n. 14, p. 258-263, 1993.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to home-cooked hamburger-California, July 1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 43, n. 12, p. 213-216, 1994.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis-United States, 1998. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 47, n. 50, p. 1085-1086, 1998.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis-United States, 2000. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. 50, p. 1129-1130, 2000.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating ground beef-United States, June-July 2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 51, n. 29, p. 637-639, 2002a.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport-United States, January-April 2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 51, n. 25, p. 545-548, 2002b.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Public health dispatch: outbreak of listeriosis-Northeastern United States, 2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 51, n. 42, p. 950-951, 2002c.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium associated with rodents purchased at retail pet stores-United States, December 2003-October 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 54, n. 17, p. 429-433, 2005.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections associated with eating ground beef-United States, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 55, n. 7, p. 180-182, 2006.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. **Salmonella Surveillance**: annual summary, 2005. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2007.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 States, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 57, n. 14, p. 366-370, 2008a.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Listeriosis general information**. 2008b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html>. Acesso em: 31 dez. 2009.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with beef from fairbank farms**. 2009a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/2009/index.html>>. Acesso em: 27 dez. 2009.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, 2008. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 301, n. 20, p. 2088-2090, 2009b.

CE. Comissão Europeia. Regulamento (CE) nº 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, 15 nov. 2005, p. L338/1-L338/26.

CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; JOAQUIM, R. M.; ANDRADE, J. R. C. High occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 70, n. 1-2, p. 111-121, 1999.

CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A.; WRIGHT, D. J.; NORMAN, P.; FOX, J.; CRICK, E. Cattle as a possible source of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 111, p. 439-447, 1993.

CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A.; CERDAN MALO, A. T.; HARKIN, M. A. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 119, p. 245-250, 1997.

CHEN, J.; ZHANG, L.; PAOLI, G. C.; SHI, C.; TU, S.; SHI, X. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2-3, p. 168-174, 2010.

COILLIE, E. V.; WERBROUCK, H.; HEYNDRIKX, M.; HERMAN, L.; RIJPENS, N. Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food products on the Belgian market. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 11, p. 2480-2487, 2004.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac", Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Informe-Net DTA-Doenças transmitidas por alimentos e água: *Escherichia coli* O157:H7-Enterohemorrágica (EHEC)**. 2000. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Ecolinet.htm>>. Acesso em: 27 dez. 2009.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Informe-Net DTA-Doenças transmitidas por alimentos e água: *Listeria monocytogenes*/Listeriose.** 2003. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Listeria.htm>>. Acesso em: 31 dez. 2009.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Informe-Net DTA-Doenças transmitidas por alimentos e água: *Salmonella* Enteritidis/Salmoneloses.** Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_59Sen.htm>. Acesso em: 7 jan. 2010.

DARGATZ, D. A.; FEDORKA-CRAY, P. J.; LADELY, S. R.; KOPRAL, C. A.; FERRIS, K. E.; HEADRICK, M. L. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolates from US cattle in feedlots in 1999 and 2000. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 4, p. 753-761, 2003.

DAVIES, R. H.; DALZIEL, R.; GIBBENS, J. C.; WILESMITH, J. M.; RYAN, J. M. B.; EVANS, S. J.; BYRNE, C.; PAIBA, G. A.; PASCOE, S. J. S.; TEALE, C. J. National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 750-760, 2004.

DECHET, A. M.; SCALLAN, E.; GENSHEIMER, K.; HOEKSTRA, R.; GUNDERMAN-KING, J.; LOCKETT, J.; WRIGLEY, D.; CHEGE, W.; SOBEL, J. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium definitive type 104 infection linked to commercial ground beef, Northeastern United States, 2003-2004. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, n. 6, p. 747-752, 2006.

DER, G.; EVERITT, B. S. **A handbook of statistical analyses.** 2 ed. Chapman & Hall/CRC: Boca Raton. 2002. 360 p.

DESTRO, M. T. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle. In:_____.
Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 9, p. 155-164.

DEWELL, G. A.; RANSOM, J. R.; DEWELL, R. D.; MCCURDY, K.; GARDNER, I. A.; HILL, A. E.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SMITH, G. C.; SALMAN, M. D. Prevalence of and risk factors for *Escherichia coli* O157 in market-ready beef cattle from 12 U.S. feedlots. **Foodborne Pathogens and Disease**, Nova Iorque, v. 2, n. 1, p. 70-76, 2005.

DIEZ-GONZALEZ, F., CALLAWAY, T. R., KIZOULIS, M. G., RUSSEL, J. B. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. **Science**, Washington, v. 281, n. 5383, p. 1666–1668, 1998.

DONKERSGOED, J. VAN; JERICHO, K. W. F.; GROGAN, H.; THORLAKSON, B. Preslaughter hide status of cattle and the microbiology of carcasses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 12, p. 1.502-1.508, 1997.

DONKERSGOED, J. V.; GRAHAM, T.; GANNON, V. The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in feces and rumen of cattle at processing. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 40, n. 5, p. 332-338, 1999.

DRUBI, A. J. **Estudo microbiológico de matérias-primas processadas de origem animal utilizadas na fabricação de alimentos na região de Ribeirão Preto/SP**. 2005. 46 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

DUPONT QUALICON. **Sistema BAX®. Análise em PCR com detecção automatizada: Manual do usuário**. 2005. 107p.

EDUARDO, M. B. P.; MELLO, M. L. R.; KATSUYA, E. M.; CAMPOS, J. C.; KITAGAWA, B. Y. **Síndrome hemolítico-urêmica – normas e instruções**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Secretaria de Estado da Saúde, 2002. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/shu.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2009.

EISEL, W. G.; LINTON, R. H.; MURIANA, P. M. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red processing plant. **Food Microbiology**, Londres, v. 14, p. 273-282, 1997.

ELDER, R. O.; KEEN, J. E.; SIRAGUSA, G. R.; BARKOCY-GALLAGHER, G. A.; KOOHMARAIE, M.; LAEGREID, W. W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 7, p. 2999-3003, 2000.

EC. European Communities. Commission decision of 8 June 2001 laying down rules for the regular checks on the general hygiene carried out by the operators in establishments in accordance with Directive 609/66/EEC on health conditions for the production and marketing of fresh meat and Directive 71/118/EEC on health problems affecting the production and placing on the market of fresh poultry meat (2001/471/EC). **Official Journal of the European Communities**, Bruxelas, 8 Jun. 2001. p. L165/48.

EUSTACE, I.; MIDGLEY, J.; GIARRUSSO, C.; LAURENT, C.; JENSON, I.; SUMNER, J. An alternative process for cleaning knives used on meat slaughter floors. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 23-27, 2007.

FDA. Food and Drug Administration. **Bad Bug Book: Escherichia coli O157:H7 (EHEC)**. 2009a. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/ucm071284.htm>>. Acesso em: 30 dez. 2009.

FDA. Food and Drug Administration. **Bad Bug Book: *Listeria monocytogenes***. 2009b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070064.htm>>. Acesso em: 30 dez. 2009.

FDA. Food and Drug Administration. **Bad bug book: *Salmonella* spp.** 2009c. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/ucm069966.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

FEGAN, N.; VANDERLINDE, P.; HIGGS, G.; DESMARCHELIER, P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 362-370, 2004a.

FEGAN, N.; VANDERLINDE, P.; HIGGS, G.; DESMARCHELIER, P. Quantification and prevalence of *Salmonella* in beef cattle presenting at slaughter. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 5, p. 892-898, 2004b.

FELÍCIO, P. E. **Valor nutritivo da carne**. SIC-Serviço de Informação da Carne. Disponível em: <<http://www.sic.org.br/PDF/Valornutritivo.pdf>>. Acesso em: 8 dez. 2009.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A. **Bacteriological analytical manual: enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria**. cap. 4, 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm>>. Acesso em: 17 jan. 2010.

FITZGERALD, A. C.; EDRINGTON, T. S.; LOOPER, M. L.; CALLAWAY, T. R.; GENOVESE, K. J.; BISCHOFF, K. M.; MCREYNOLDS, J. L.; THOMAS, J. D.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Antimicrobial susceptibility and factors affecting the shedding of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* in dairy cattle. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 392-398, 2003.

FONTOURA, C. L. **Estudo microbiológico em carcaças bovinas e influência da refrigeração sobre a microbiota contaminante**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

FOX, J. T.; RENTER, D. G.; SANDERSON, M. W.; NUTSCH, A. L.; SHI, X.; NAGARAJA, T. G. Associations between the presence and magnitude of *Escherichia coli* O157 in feces at harvest and contamination of preintervention beef carcasses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 9, p. 1761-1767, 2008.

FRANÇA FILHO, A. T. **Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação**. 2005. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

FRANCHIN, P. R.; OGLIARI, P. J.; ANDRADE, D. F.; CHIAPINOTO, M.; LEMOS, G.; REBELATTO, M.; SILVA, I. G.; BATISTA, C. R. V. Comparison of the BAX system with an in-house MSR/V method for the detection of *Salmonella* in chicken carcasses and pork meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 521-526, 2006.

FRANCO, B. D. G. M. Métodos de análise. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. (Ed.). **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 10, p. 165-176.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In:_____. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 4, p. 33-82.

FSA. Food Standards Agency. **Sponge sampling of red meat carcasses**. Disponível em: <<http://www.ukmeat.org/RedMeatCarcasses.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2010.

GANSHEROFF, L. J.; O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: higher prevalence rates than previously estimated. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 7, p. 2959-2961, 2000.

GARCÍA-ÁLVAREZ, M.; CHAVES, F. Listeriosis: la punta del iceberg. **Medicina Clínica**, Barcelona, v. 129, n. 6, p. 216-217, 2007.

GENIGEORGIS, C. The risk of transmission of zoonotic and human diseases by meat and meat products. In: SMULDERS, F. J. M. (Ed.). **Elimination of pathogenic organisms from meat and poultry**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1987. p. 111-147.

GHAFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; ZUTTER, L.; DAUBE, G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 1, p. 35-45, 2008.

GILL, C. O. Current and emerging approaches to assuring the hygienic condition of red meats. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 75, n. 1, p. 1-13, 1995.

GILL, C. O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In:_____. **The microbiology of meat and poultry**. Londres: Blackie Academic & Professional, 1998. cap. 4, p. 119-157.

GILL, C. O.; BADONI, M. Effects of experience with swabbing procedures on the numbers of bacteria recovered from carcasses by swabbing with sponges. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 73, n. 4, p. 747-751, 2010.

GIL, C. O.; JONES, T. The microbiological effects of breaking operations on hanging beef carcass sides. **Food Research International**, Barking, v. 32, p. 453-459, 1999.

GILL, C. O.; MCGINNIS, J. C. Contamination of beef trimmings with *Escherichia coli* during a carcass breaking process. **Food Research International**, Barking, v. 33, p. 125-130, 2000.

GILL, C. O.; MCGINNIS, J. C.; BADONI, M. Assessment of the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 2, p. 136-140, 1996a.

GILL, C. O.; MCGINNIS, J. C.; BADONI, M. Use of total or *Escherichia coli* counts to assess the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 1-3, p. 181-196, 1996b.

GILL, C. O.; DESLANDES, B.; RAHN, K.; HOUDE, A.; BRYANT, J. Evaluation of the hygienic performances of the processes for beef carcass dressing at 10 packing plants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 6, p. 1050-1058, 1998.

GILL, C. O.; BADONI, M.; MCGINNIS, J. C. Assessment of the adequacy of cleaning of equipment used for breaking beef carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 1-8, 1999.

GOTTLIEB, S. L.; NEWBERN, E. C.; GRIFFIN, P. M.; GRAVES, L. M.; HOEKSTRA, R. M.; BAKER, N. L.; HUNTER, S. B.; HOLT, K. G.; RAMSEY, F.; HEAD, M.; LEVINE, P.; JOHNSON, G.; SCHOONMAKER-BOPP, D.; REDDY, V.; KORNSTEIN, L.; GERWEL,

M.; NSUBUGA, J.; EDWARDS, L.; STONECIPHER, S.; HURD, S.; AUSTIN, D.; JEFFERSON, M. A.; YOUNG, S. D.; HISE, K.; CHERNAK, E. D.; SOBEL, J. Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, n. 1, p. 29-36, 2006.

GRACEY, J. F.; COLLINS, D. S. **Meat hygiene**. 9th. ed. Londres: Baillière Tindall, 1992. 549 p.

GRIFFIN, P. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: BLASER, M. J.; SMITH, P. D.; RAVDIN, J. I.; GREENBERG, H. B.; GUERRANT, R. L. (Ed.). **Infections of the gastrointestinal tract**. Nova Iorque: Raven Press Ltd., 1995. p. 739-761.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. **Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars**. 9th. ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* Institute Pasteur, 2007. p.13.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M. L.; GUSTAVSSON, P.; THORKELSSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A. M.; NICLASEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, Londres, v. 21, n. 2, p. 217-225, 2004.

HANSSON, I. B. Microbiological meat quality in high- and low-capacity slaughterhouses in Sweden. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 6, p. 820-825, 2001.

HOGUE, A. T.; WHITE, P. L.; HEMINOVER, J. A. Pathogen reduction and hazard analysis and critical control point (HACCP) systems for meat and poultry. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Filadélfia, v. 14, n. 1, p. 151-164, 1998.

HOLT, J. G. ; KRIEG, N. R. ; SNEATH, P. H. A. ; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HOUSE, D.; BISHOP, A.; PARRY, C.; DOUGAN, G.; WAIN, J. Typhoid fever: pathogenesis and disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Filadélfia, v. 14, n. 1, p. 573-578, 2001.

HOVDE, C. J.; AUSTIN, P. R.; CLOUD, K. A.; WILLIAMS, C. J.; HUNTI, C. W. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 7, p. 3233-3235, 1999.

HOWELL, D. C. Multiple comparisons among treatment means. In:_____. **Statistical for psychology**. Duxbury Press: Boston, 1982. p. 297-334.

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk, **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 3, p. 852-867, 1997.

HUTCHISON, M. L.; WALTERS, L. D.; AVERY, S. M.; REID, C. A.; WILSON, D.; HOWELL, M.; JOHNSTON, A. M.; BUNCIC, S. A comparison of wet–dry swabbing and excision sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine, and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 10, p. 2155–2162, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Rebanho bovino cai para 205,9 milhões de cabeças em 2006**. Comunicação social. 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1053>. Acesso em: 02 dez. 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Abate de animais, produção de leite, couro e ovos**. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_200902_1.shtm>. Acesso em: 02 dez. 2009a.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2006**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/tab_brasil/tab8.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2009b.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1984. 431 p.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 361 p.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Listeria monocytogenes*. **Microorganismos de los alimentos** – Características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1998. 606 p.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos indicadores. In: _____. **Microorganismos de los alimentos 1 - Su significado y métodos de enumeración**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. part. 1, p. 3-14.

IIDA, T.; KANZAKI, M.; MARUYAMA, T.; INOUE, S.; KANEUCHI, C. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v. 53, n. 5, p. 873-875, 1991.

IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; VAZ, T. M. I.; RAMOS, I. I.; SOUZA, M. A. C.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 29-36, 2005.

JARDIM, F. B. B.; SILVA, E. N.; OKURA, M. H.; RAMOS, M. A. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 277-282, 2006.

JAY, J. M. Indices de calidad higiénica de los alimentos y estándares microbiológicos. In: _____. **Microbiología moderna de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1978. cap. 15, p. 300-330.

JOHNSON, R. P.; CLARKE, R. C.; WILSON, J. B.; READ, S. C.; RAHN, K.; RENWICK, S. A.; SANDHU, K. A.; ALVES, D.; KARMALI, M. A.; LIOR, H.; McEWEN, S. A.; SPIKA, J. S.; GYLES, C. L. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 10, p. 1112-1122, 1996.

KALCHAYANAND, N.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; GUERINI, M. N.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M. Prevalence rates of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* at different sampling sites on cattle hides at a feedlot and processing plant. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 6, p. 1267-1271, 2009.

KALENDER, H. Detection of *Listeria monocytogenes* in faeces from chickens, sheep and cattle in Elazig province. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Elazig, v. 27, n. 1, p. 449-451, 2003.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews. Microbiology**, Londres, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KEEN, J. E.; UHLICH, G. A.; ELDER, R. O. Effects of hay and grain-based diets on fecal shedding in naturally-acquired enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157 in beef feedlot cattle. In: **CONFERENCE RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASES**, 80th, 1999, Chicago, IL. **Abstracts...**

KENNEDY, J. E.; WILLIAMS, S. K.; BROWN, T.; MINERICH, P. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and indicator organisms on the surface of intact subprimal beef cuts prior to further processing. **Journal of Food Microbiology**, Des Moines, v. 69, n. 7, p. 1514-1517, 2006.

KÉROUANTON, A.; MARAULT, M.; PETIT, L.; GROUT, J.; DAO, T. T.; BRISABOIS, A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. **Journal of Microbiological Methods**, Trumbull, v. 80, n. 2, p. 134-137, 2010.

LANDGRAF, M. Microorganismos indicadores. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. (Ed.). **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 3, p. 27-32.

LANGONI, H.; LINHARES, A. C.; AVILA, F. A.; SILVA, A. V.; ELIAS, A. O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 5, p. 313-319, 2004.

LA PEÑA, E. C.; IGLESIAS, A. L. H.; JIMÉNEZ, M. A. H.; MARTINEZ, R. B.; LEÓN, J. M.; CABELLO, F. A.; FRAUSTO, M. S. R.; ROSALES, S. P. L. Brote por *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. **Salud Pública de México**, México, v. 43, n. 3, p. 211-216, 2001.

LITTLE, C. L.; RICHARDSON, J. F.; OWEN, R. J.; PINNA, E.; THRELFALL, E. J. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw meats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005. **Food Microbiology**, Londres, v. 25, n. 3, p. 538-543, 2008.

LITTLE, C. L.; SAGOO, S. K.; GILLESPIE, I. A.; GRANT, K.; MCLAUCHLIN, J. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in selected retail-to-eat foods in the United Kingdom. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 9, p. 1869-1877, 2009.

LOOPER, M. L.; EDRINGTON, T. S.; FLORES, R.; ROSENKRANS, C. F. Jr.; NIHSEN, M. E.; AIKEN, G. E. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in beef steers consuming different forage diets. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 583-588, 2006.

LOOPER, M. L.; EDRINGTON, T. S.; ROSENKRANS, C. F. Jr. Influence of body condition and forage type on prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in grazing beef cows. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 361-365, 2009.

LOW, J. C.; DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 153, n. 1, p. 9-29, 1997.

LUTZKY, M.; KALIL, M. A. S.; LAKS, D.; LONGHI, F.; NETO, E. J. D.; CARVALHAL, G. F.; SANVITTO, P. C. Púrpura trombocitopênica trombótica decorrente de infecção urinária complicada. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 48, n. 4, p. 261-264, 2004.

MACKEY, B. M.; ROBERTS, T. A. Improving slaughter hygiene using HACCP and monitoring. **Fleischwirtschaft International**, Frankfurt, v. 2, p. 40-45, 1993.

MADDEN, R. H.; ESPIE, W. E.; MORAN, L.; McBRIDE, J.; SCATES, P. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in Northern Ireland. **Meat Science**, Barking, v. 58, p. 343-346, 2001.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina moída comercializadas no município de Niterói, RJ, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1225-1230, 2007.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 2, p. 145-156, 2000.

MARKKULA, A.; AUTIO, T.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 6, p. 1228-1231, 2005.

MARTÍNEZ, B.; CELDA, M. F.; MILLÁN, M. E.; ESPACIO, A.; CANO, M.; LÓPEZ-MENDOZA, M. C. Assessment of the microbiological conditions of red-meat carcasses from bacterial counts recovered by sampling via excision or swabbing with cotton wool. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 770-776, 2009.

MARTÍNEZ, B.; CELDA, M. F.; ANASTASIO, B.; GARCÍA, I.; LÓPEZ-MENDONZA, M. C. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing with three types of sponge or gauze. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 73, n. 1, p. 81-87, 2010.

MARZOCCA, M. A.; MARUCCI, P. L.; SICA, M. G.; ALVAREZ, E. E. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 36, p. 179-81, 2004.

MASANA, M. O.; LEOTTA, G. A.; CASTILLO, L. L. D.; D'ASTEK, B. A. D.; PALLADINO, P. M.; GALLI, L.; VILACOBIA, E.; CARBONARI, C.; RODRÍGUEZ, H. R.; RIVAS, M. Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 73, n. 4, p. 649-656, 2010.

MATULSKY, H. J. Prism 4. **Statistics guide – Statistical analyses for laboratory and clinical researchers**. GraphPad Software Inc., San Diego CA, 2003.

MAYRHOFER, S.; PAULSEN, P.; SMULDERS, F. J. M.; HILBERT, F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 97, n. 1, p. 23-29, 2004.

McCLEERY, D. R.; STIRLING, J. M. E.; McIVOR, K.; PATTERSON, M. F. Effect of ante- and postmortem hide clipping on the microbiological quality and safety and ultimate pH value of beef carcasses in an EC-approved abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 5, p. 1471-79, 2008.

McEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A. The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 4, p. 693-700, 2003a.

McEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J.; THOMSON-CARTER, F. M.; GARVEY, P.; McGUIRE, L.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A. The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at commercial beef abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 2, p. 256-266, 2003b.

McEVOY, J. M.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A. Microbial contamination on beef in relation to hygiene assessment based on criteria used in EU Decision 2001/471/EC. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 217-225, 2004.

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

MEICHTRI, L.; MILIWEBSKY, E.; GIOFFRÉ, A.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; CHILLENI, G.; GUTH, B. E. C.; MASANA, M. O.; CATALDI, A.; RODRÍGUEZ, H. R.; RIVAS, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 2, p. 189-198, 2004.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P. A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, Londres, v. 21, n. 1, p. 213-16, 2004.

MILLER, M. F.; LONERAGAN, G. H.; HARRIS, D. D.; ADAMS, K. D.; BROOKS, J. C.; BRASHEARS, M. M. Environmental dust exposure as a factor contributing to an increase in *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* populations on cattle hides in feedyards. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 10, p. 2078-81, 2008.

MINIHAN, D.; WHYTE, P.; O'MAHONY, M.; COLLINS, J. D. The effect of commercial steam pasteurization on the levels of *Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli* on naturally contaminated beef carcasses. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, Berlim, v. 50, n. 7, p. 352-356, 2003.

MOHAMMED, H. O.; ATWILL, E.; DUNBAR, L.; WARD, T.; MCDONOUGH, P.; GONZALEZ, R.; STIPETIC, K. The risk of *Listeria monocytogenes* infection in beef cattle operations. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 1, p. 349-356, 2010.

MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 107-121, 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NIELSEN, E. M.; TORPDAHL, M.; ETHELBERG, S.; HAMMERUM, A. M. Resistance in sporadic and outbreak-related *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 1, p. 101-113, 2009.

OMISAKIN, F.; MACRAE, M.; OGDEN, I. D.; STRACHAN, N. J. C. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2444-2447, 2003.

ORDOÑEZ, J. G.; TRABULSI, L. R. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). In: _____. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005, cap. 37, p. 285-288.

O'SULLIVAN, D. J. Methods for analysis of the intestinal microflora. In: TANNOCK, G.W. (Ed). **Probiotics: a critical review**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 1999. cap. 3, p. 23-44.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. Aspectos higiênicos-sanitários da carne. In: _____. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**, part. 4, v. 1

(Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação), 2. ed., Goiânia: UFG, 2006. p. 271-490.

PARRY, C. M.; HIEN, T. T.; DOUGAN, G.; WHITE, N. J.; FARRAR, J. J. Medical progress: typhoid fever. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 347, n. 22, p. 1770-1782, 2002.

PEARCE, R. A.; BOLTON, D. J. Excision vs sponge swabbing – a comparison of methods for the microbiological sampling of beef, pork and lamb carcasses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, p. 896-900, 2005.

PECCIO, A.; AUTIO, T.; KORKEALA, H.; ROSMINI, R.; TREVISANI, M. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 234-238, 2003.

PHILLIPS, D.; SUMNER, J.; ALEXANDER, J.; DUTTON, K. Microbiological quality of Australian beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 5, p. 692-96, 2001.

PHILLIPS, D.; JORDAN, D.; MORRIS, S.; JENSON, I.; SUMNER, J. A national survey of the microbiological quality of beef carcasses and frozen boneless beef in Australia. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 5, p. 1113-17, 2006.

PRANDL, O.; FISCHER, A.; SCHMIDHOFER, T.; SINELL, H. J. **Tecnología e higiene de la carne**. Zaragoza: Acribia, 1994. 854 p.

PRATA, L. F.; FUKUDA, R. T. **Fundamentos de higiene e inspeção de carnes**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 349 p.

PRENDERGAST, D. M.; ROWE, T. A.; SHERIDAN, J. J. Survival of *Listeria innocua* on hot and cold beef carcass surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 6, p. 2721-2729, 2007.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Família *Enterobacteriaceae*. In:_____. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 18, p. 115-130.

RANGEL, J. M.; SPARLING, P. H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P. M.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 4, p. 603-609, 2005.

RIGOBELLO, E. C.; STELLA, A. E.; ÁVILA, F. A.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 194-198, 2006.

RILEY, D. G.; LONERAGAN, G. H.; PHILLIPS, W. A.; GRAY, J. T.; FEDORKA-CRAY, P. J. Fecal shedding of foodborne pathogens by Florida-born heifers and steers in U.S. beef production segments. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 4, p. 807-810, 2008.

ROELS, T. H., FRAZAK, P. A., KAZMIERCZAK, J. J., MACKENZIE, W. R., PROCTOR, M. E.; KURZYNSKI, T. A., DAVIS, J. P. Incomplete sanitation of a meat grinder and ingestion of raw ground beef: contributing factors to a large outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 119, p. 127-134, 1997.

RUGGENENTI, P.; REMUZZI, G. Thrombotic thrombocytopenic purpura and related disorders. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, Filadélfia, v. 4, n. 1, p. 219-241, 1990.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. **Food Microbiology**, Londres, v. 16, p. 465-477, 1999.

SENYK, G. F.; KOZLOWSKI, S. M.; NOAR, P. S.; SHIPE, W. F.; BANDLER, D. K. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 6, p. 1152-1158, 1987.

SHALE, K.; JACOBY, A.; PLAATJIES, Z. The impact of extrinsic sources on selected indicator organisms in a typical deboning room. **International Journal of Environmental Health Research**, Abingdon, v. 16, n. 4, p. 263-272, 2006.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45^oC e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 352-359, 2006.

SILVA, N.; EIROA, M. N. U. Avaliação do meio semi-sólido de Rappaport-Vassiliadis modificado para detecção rápida de *Salmonella* em Alimentos. **Coletânea ITAL**, Campinas, v. 23, p. 68-77, 1993.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SINELL, H. J. Microbiología de la carne. In:_____. **Tecnología e higiene de la carne**, Zaragoza: Acribia, 1994. part. 4, p. 170-197.

STOLLE, A. Spreading of salmonellas during cattle slaughtering. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 239-245, 1981.

STOPFORTH, J. D.; LOPES, M.; SHULTZ, J. E.; MIKSCH, R. R.; SAMADPOUR, M. Microbiological status of fresh beef cuts. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 6, p. 1456-1459, 2006.

SUMNER, J.; PETRENAS, E.; DEAN, P.; DOWSETT, P.; WEST, G.; WIERING, R.; RAVEN, G. Microbial contamination on beef and sheep carcasses in South Australia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 255-260, 2003.

TABE, E. S.; OLOYA, J.; DOETKOTT, D. K.; BAUER, M. L.; GIBBS, P. S.; KHAITSA, M. L. Comparative effect of direct-fed microbials on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in naturally infected feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 3, p. 539-544, 2008.

TERGNEY, A.; BOLTON, D. J. Validation studies on an online monitoring system for reducing faecal and microbial contamination on beef carcasses. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 378-382, 2006.

TICE, G.; ANDALORO, B.; WHITE, H. K.; BOLTON, L.; WANG, S.; DAVIS, E.; WALLACE, M. In-house validation study of the DuPont Qualicon BAX[®] system Q7 instrument with the BAX system PCR assay for *Salmonella* (modification of AOAC

*Official Method*SM 2003.09 and AOAC Research Institute *Performance-Tested Method*SM 100201). **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 92, n. 3, p. 989-994, 2009.

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 4, p. 709-725, 2002.

3M. **Petrifilm**TM: *E. coli*/coliform count plate. St. Paul, 2004. p. 49, 53.

TRISTÃO, L. C. S.; GONZALEZ, A. G. M.; COUTINHO, C. A. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; GOMES, M. J. P.; IRINO, K.; GUTH, B. E. C.; ANDRADE, J. R. C. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 2-4, p. 358-365, 2007.

UHITIL, S.; JAKI, S.; PETRAK, T.; MEDI, H.; GUMHALTER-KAROLYI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 3, p. 213-216, 2004.

USDA. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Department of Agriculture. **Pathogen reduction; Hazard analysis and critical control point (HACCP) systems; final rule.**, p. 38805-38989. (Federal Register, v. 61, n. 144 – Rules and Regulations). 1996. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/93-016F.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2009.

USDA. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Microbiology. **Progress report on Salmonella testing of raw meat and poultry products, 1998-2008.** 2009. Disponível em: <

www.fsis.usda.gov/Science/Progress_Report_Salmonella_Testing/index.asp>. Acesso em: 25 fev. 2010.

VARNAM, A. H. **Foodborne pathogens**. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. 557 p.

VÁZQUEZ-SALINAS, C.; RODAS-SUÁREZ, O.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E. I. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico City. **Food Microbiology**, Londres, v. 18, n. 2, p. 177-181, 2001.

VELING, J.; BARKEMA, H. W.; VAN DER SCHANS, J.; VAN ZIJDERVELD, F.; VERHOEFF, J. Herd-level diagnosis for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin infection in bovine dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 31-42, 2002.

VICENTE, H. I. G. **Escherichia coli, produtoras de shigatoxinas, detectadas em fezes de bovinos leiteiros e em diferentes pontos do processo de ordenha**. 2006. 83f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 349-356, 2004.

VO, A. T. T.; VAN DUIJKEREN, E.; FLUIT, A. C.; HECK, M. E. O. C.; VERBRUGGEN, A.; MAAS, H. M. E.; GAASTRA, W. Distribution of *Salmonella enterica* serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the dominance of *Salmonella* Typhimurium phage type 90. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1-2, p. 153-158, 2006.

VOLD, L.; KLUNGSETH JOHANSEN, B.; KRUSE, H.; SKJERVE, E.; WASTESON, Y. Occurrence of shigatoxigenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 120, p. 21-28, 1998.

ZAR, T. H. **Biostatistical analysis**. 4 ed. Prentice Hall: New Jersey, 1999, 663 p.

ZEN, S. **A cadeia da carne bovina no Brasil**. 2004. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2000/artigo.2004-12-07.2530561427>>. Acesso em: 8 dez. 2009.

ZWEIFEL, C.; BALTZER, D.; STEPHAN, R. Microbiological contamination of cattle and pig carcasses at five abattoirs determined by swab sampling in accordance with EU Decision 2001/471/EC. **Meat Science**, Barking, v. 69, n. 3, p. 559-566, 2005.

ZWEIFEL, C.; FISCHER, R.; STEPHAN, R. Microbiological contamination of pig and cattle carcasses in different small-scale Swiss abattoirs. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 3, p. 225-231, 2008.

YOSHITOMI, K. J.; JINNEMAN, K. C.; WEAGANT, S. D. Detection of shiga toxin genes *stx1*, *stx2*, and the +93 *uidA* mutation of *E. coli* O157:H7/H-using SYBR® Green I in a real-time multiplex PCR. **Molecular and Cellular Probes**, Londres, v. 20, n. 1, p. 31-41, 2006.

WIDIASIH, D. A.; IDO, N.; OMOE, K.; SUGII, S.; SHINAGAWA, K. Duration and magnitude of faecal shedding of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 132, p. 67-75, 2003.

WHO. World Health Organization. **Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)**. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>>. Acesso em: 23 dez. 2009.

WHO. World Health Organization. **Hazard Analysis Critical Point System (HACCP)**. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/haccp/en/print.html>. Acesso em: 03 dez. 2009.

WHO/FAO. World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Microbiological risk assessment series 1. Risk assessment of *Salmonella* in eggs and broiler chickens – interpretative summary**. Roma, 2002. p. 3.

WHO/FAO. World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra4.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2009.

WRAY, C.; DAVIES, R. H. *Salmonella* infections in cattle. In:_____. ***Salmonella* in domestic animals**. Wallingford: CABI Pub, 2000. cap. 10, p. 169-190.