

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
SHIGATOXIGÊNICA ISOLADA EM ESTABELECIMENTOS
COMERCIAIS NO MUNICÍPIO DE TAQUARITINGA, S.P.**

Daniela Rodolpho

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Outubro de 2006

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Daniela Rodolpho - nascida aos 07 de dezembro de 1976 no município de Taquaritinga - SP. Formada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, aos 22 de janeiro de 2000. Especialista em Saúde Pública pela Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, em 25 de abril de 2002. Obteve o título de Mestre em Microbiologia pela Faculdade de Ciências Agrárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, em 04 de dezembro de 2002. Atua como Médica Veterinária junto à Vigilância Sanitária da Secretaria Municipal de Saúde do município de Taquaritinga-SP, desde abril de 2001.

“Ser feliz não é ter uma vida perfeita.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,
apesar de todos os desafios, perdas e frustrações.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas
e se tornar autor da própria história.”
(Augusto Cury)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Osvaldo Rodolpho Filho e Diva Geni da Rocha Rodolpho, pela dedicação por completo em todas as fases de minha vida, pelos esforços feitos em pró de minha formação, educação e tudo tratado com muito amor.

À minha irmã, Perla Christina Rodolpho, a quem admiro muito e principalmente a meu orientador, Prof Dr. José Moacir Marin, por todo aprendizado durante este período, a confiança e o coleguismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença principalmente nos momentos mais difíceis atravessados neste período.

À técnica do laboratório, Tânia Marques da Silva, pelas várias assistências prestadas durante o desenvolvimento prático do trabalho.

Às amigas e amigos do laboratório por todo apoio prestado no decorrer destes anos, principalmente a Vanessa Parpinelli que me acompanhou em muitas fases do desenvolvimento deste trabalho.

A Walter Cristian Vivancos de Souza, pelas ajudas prestadas durante o trabalho, o incentivo e dedicação, sendo uma pessoa a qual respeito e admiro muito.

Ao amigo Aristeu de Campos Silva pelo auxílio para que pudesse realizar este curso e me incentivando durante toda jornada.

Aos proprietários dos estabelecimentos onde foram realizadas as coletas de amostras, pois sem eles este trabalho não seria possível.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1. Carne como Veículo em Transmissão Alimentar.....	02
2.2. Qualidade Higiênico-Sanitária dos Alimentos.....	03
2.3. Riscos de Doenças Veiculadas por Alimentos.....	10
2.4. O Gênero <i>Escherichia</i>	17
2.5. Higiene de Equipamentos.....	21
2.6. Manipulação de Alimentos.....	23
2.7. Antimicrobianos.....	26
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Coleta, Transporte e Semeadura das Amostras.....	32
4.1.1. Carne.....	32
4.1.2. Mãos dos Manipuladores.....	33
4.1.3. Superfície de Equipamentos.....	33
4.2. Análise Microbiológica.....	34
4.2.1. Teste Presuntivo.....	34
4.2.2. Teste Confirmativo.....	37
4.2.3. Isolamento de <i>E. coli</i>	37
4.2.4. Provas Bioquímicas.....	38
4.3. Extração de DNA Template.....	39
4.4. Determinação de Gene de Virulência (<i>stx</i> 1, <i>stx</i> 2 e <i>eae</i>).....	40
4.5. O ₁₅₇ Latex Aglutinação.....	41
4.6. Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	59

7. REFERÊNCIAS.....60

APÊNDICE.....79

LISTA DE ABREVIATURAS

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

CEC – Caldo *Escherichia coli*

CLSS – Caldo Lauril Sulfato de Sódio

DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderente

E. coli – *Escherichia coli*

eae – gene da intimina

EaggEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva

EMB – Eosina Azul de Metileno

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

HUS – Síndrome Urêmica Hemolítica

LB – Luria Bertani

MHM – Agar Müller Hinton

NMP – Número Mais Provável

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PPHO – Procedimento Padrão de Higiene Operacional

STEC – *Escherichia coli* shigatoxigênica

stx – shiga-toxina

TSI – Agar Ferro Tríplice Açúcar

VHA – Vírus da Hepatite tipo A

CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* SHIGATOXIGÊNICA ISOLADA EM ESTABELECIMENTOS COMERCIAIS NO MUNICÍPIO DE TAQUARITINGA, S.P.

RESUMO - *Escherichia coli* Shigatoxigênica (STEC) tem sido implicada como agente causador de severas doenças humanas. Amostras de carne moída, moedor de carne e mãos de manipuladores de 23 estabelecimentos comerciais foram testadas para o isolamento de *E. coli* usando métodos microbiológicos padronizados. Um total de 287 cepas de *E. coli* isoladas destes diferentes locais foram submetidas ao PCR para detecção de genes *stx* 1, *stx* 2 e *eae*. As cepas positivas para o gene *stx* foram analisadas verificando se pertenciam ao sorogrupo O₁₅₇. Quatro cepas de STEC foram isoladas, sendo 2 de carne moída e 2 de moedor de carne, todas possuíam o gene *stx* 2, sendo negativas para a presença do gene *eae* e o sorogrupo O₁₅₇. Todas as *E. coli* isoladas, incluindo as 4 STEC, foram pesquisadas para sua resistência a 12 antibióticos. Altos níveis de resistência frente aos diferentes agentes antimicrobianos foram detectados; as resistências maiores foram observadas para a tetraciclina (76,6%), amoxicilina (64,1%) e cefalotina (58,8%). Os altos níveis de resistência antimicrobiana salientam a necessidade para a utilização racional destes agentes em bovinos. Foram observadas índices elevados de sensibilidade frente a associação amoxicilina + ácido clavulânico (96,6%), ceftriaxona (92,7%) e gentamicina (90,3%).

Palavras-Chave: bovino, carne moída, *Escherichia coli*, resistência antibiótica, STEC, *stx* 2.

CHARACTERIZATION OF SHIGATOXIGENIC *Escherichia coli* ISOLATED FROM RETAIL MEAT STORES IN TAQUARITINGA, S.P.

SUMMARY - Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) has been implicated as the causative agent of several human diseases. Samples from 23 retail meat stores (ground beef, grinding-machine and human hand) were assayed for *E. coli* isolation using microbiological standard methods. A total of 287 *E. coli* isolates from these different origins were submitted to polymerase chain reaction for the detection of *stx* 1, *stx* 2 and *eae* genes. The isolates positives for *stx* gene were serotyped for O₁₅₇. Four STEC isolates were recovered, 2 from ground beef and 2 from grinding-machine; all harbored the *stx* 2 gene and were negative for the presence of the *eae* gene and the serogroup O₁₅₇. All *E. coli* isolates including the four STEC were screened for antibiotic resistance. High levels of resistance against different antimicrobial agents were detected; those most commonly observed were to tetracycline (76.6%), amoxicillin (64.1%) and cephalothin (58.8%). Such high levels of antimicrobial agents' resistance highlight the need for a more rational use of these agents in cattle. Susceptibility was high for amoxicillin + clavulanic acid (96,6%), ceftriaxone (92,7%) and gentamicin (90,3%).

Keywords: cattle, ground beef, *Escherichia coli*, antibiotic resistance, STEC, *stx* 2.

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* faz parte do grupo dos coliformes fecais e é tida como o agente de enfermidades veiculadas por alimentos, causando desde diarreia simples a severa sanguinolenta. Mais especificamente a *E. coli* shigatoxigênica tem sido incriminada como principal agente etiológico de colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica (HUS) e falência renal podendo, em alguns casos, levar à morte. Possuem como fatores de virulência o gene *stx* (shiga toxina) 1 e 2, que inibem a síntese protéica levando a morte celular, e o gene *eae* (intimina) relacionado à capacidade de adesão que a bactéria tem à parede celular.

Apesar da *E. coli* O₁₅₇:H₇ ter sido isolada de casos clínicos, outros sorogrupos de *E. coli* não-O₁₅₇ também tem sido encontrados, sendo um dos principais reservatórios deste agente os bovinos, tanto da *E. coli* O₁₅₇:H₇ como da não-O₁₅₇.

Falhas que possam ocorrer na cadeia produtiva da carne, mais especificamente da carne moída, desde a exploração zootécnica, abate e comércio varejista favorecem a veiculação da bactéria *E. coli* levando a sua disseminação até o consumidor. Como a carne moída é um produto de grande consumo, ela se torna um veículo de transmissão de patógenos afetando principalmente imunossuprimidos, idosos e crianças.

Também o estudo da resistência antimicrobiana de *E. coli* é importante, pois esta bactéria pode estar envolvida em surtos alimentares. O conhecimento de sua susceptibilidade aos antimicrobianos é fundamental para assegurar a eficácia do tratamento. É motivo de preocupação a capacidade de transferência de genes de resistência que esta bactéria possui, seja entre elementos da mesma espécie ou espécies diferentes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Carne como Veículo em Transmissão Alimentar

A carne bovina é uma excelente fonte de proteínas de alta qualidade, de vitaminas importantes como a tiamina, riboflavina, B6 e B12, além de minerais como o zinco e o ferro. É um alimento nutricionalmente importante para a manutenção da saúde, amplamente utilizado em refeições institucionais, que requer inspeção sanitária rigorosa, conservação adequada e controle total de qualidade (REINDERS et al., 2001).

O Brasil tem se transformado no maior detentor de rebanho comercial do planeta, com aproximadamente 170 milhões de cabeças, sendo 80% destinadas ao corte ou produção de carne e 20% à produção de leite. Esses números só são inferiores ao da China onde o rebanho bovino atinge 200 milhões (ABIEC, 2002).

Tendo em vista o fato de que a carne se constitui numa das fontes básicas de proteína animal essencial para nosso organismo e estando esta sujeita à contaminação que se reflete em sua qualidade microbiológica e na saúde pública, alguns trabalhos têm isolado os microrganismos de carnes em estabelecimentos produtores, comerciais e também das mãos de operários de indústria frigorífica (BLANCO et al., 2004, DONTOROU et al., 2003, KHAN et al., 2002, RIBEIRO et al., 2000).

Diante deste fato são testadas diferentes formas de higienização para minimizar o problema referente a contaminação alimentar (RIBEIRO et al., 2000).

A carne bovina moída *in natura* tem sido reconhecida como fonte primária de infecção quando manipulada incorretamente, ocasionando graves consequências à saúde dos seres humanos, tanto os próprios manipuladores como os consumidores (LOGUERCIO et al., 2002, PIGATTO & BARROS, 2003, BLANCO et al., 2004).

Os produtos cárneos são alimentos sujeitos a grandes contaminações, por serem excelentes meios de cultura para o desenvolvimento e multiplicação dos microrganismos. O produto cárneo, mesmo que obtido de animais sadios, pode se contaminar no abate em feiras livre, açougues e supermercados e nesta situação chegar à mesa do consumidor (HEUVELINK et al., 2001, McEVOY et al., 2003).

Durante todo o processamento, a carne é manipulada por pessoas muitas vezes com falta de orientação adequada ou mesmo com descaso, colaborando para a baixa qualidade do produto. (BROOKS et al, 2001, COSTA et al., 2000, FERREIRA & SOBRINHO, 2003).

Pesquisa realizada por SPERS (2003) demonstrou que 65,8% dos consumidores comem carne 3 ou mais vezes por semana e que 49,1% compram esta somente em supermercado. Neste mesmo trabalho, foi avaliada a percepção dos comerciantes para verificar o que consideram como carne fresca.

A conservação das carnes, do mesmo modo que a maioria dos alimentos perecíveis, às vezes necessita de uma combinação de distintos sistemas de conservação. O fato de que a maioria das carnes é um excelente meio de cultivo (com elevada porcentagem de umidade e abundantes nutrientes), somado ao fato de que é possível que alguns microrganismos estejam presentes causando contaminação, faz com que a conservação das carnes seja mais difícil que a maioria das demais classes de alimentos. Alguns tratamentos para a conservação podem minimizar o crescimento bacteriano sendo seu armazenamento prolongado à temperatura de refrigeração (UNGAR et.al., 1992, PEREIRA & MACULEVICIUS, 1999, COSTA et al., 2000, ELLEBRACHT et al., 1999). Para comprovar tal fato, PALUMBO et al. (1999) demonstraram que não há aumento significativo na contagem coliforme e *Escherichia coli* de swabs de carcaças suínas submetidos a refrigeração.

2.2. Qualidade Higiênico-Sanitária dos Alimentos

A higiene dos alimentos de origem animal inicia-se nas propriedades de exploração zootécnica. As condições higiênico-sanitárias são de fundamental importância para obtenção de um alimento de qualidade e segura para o consumidor. Estas devem ser adequadas em todas as etapas do processo de obtenção que vai desde a produção, até o abate e a comercialização (ELDER et al., 2000).

Isto é demonstrado por ELDER et al. (2000) onde em um frigorífico seguindo os procedimentos sanitários é possível constatar a redução na taxa de microrganismos. Há

também que se considerar a aplicação do plano APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) nas indústrias onde é usado para diminuir o risco de doenças alimentares através dos estágios de intervenção do processo (MARTINIS et al., 2001, OLIVEIRA et al, 2002).

A completa prevenção da contaminação dos alimentos, principalmente os de origem animal, é extremamente difícil, tendo em vista a ampla distribuição de bactérias no ambiente e a freqüente existência de portadores assintomáticos. No entanto, a adoção de medidas higiênico-sanitárias no manuseio e processamento, o controle de alimentação fornecida para animais e a prevenção das contaminações cruzadas, são algumas das medidas importantes para a redução dos níveis de contaminação (FRIEDRICH et al., 2003, RANDALL et al., 1999, WASTESON et al., 2005).

Do ponto de vista de saúde pública, no Brasil, o Ministério da Saúde, através da vigilância sanitária, atua na fiscalização do comércio de alimentos, nas indústrias e nos supermercados, tentando agir de forma a minimizar os maiores problemas que possam ser encontrados nos alimentos perecíveis, como contaminações microbiológicas, devido à refrigeração inadequada, ao alto tempo de exposição, aos manipuladores e às condições inadequadas de armazenagem e manipulação (AVERY et al., 2002, COSTA et al., 2000, LAGAGGIO et al., 2002).

Outro órgão fiscalizador do governo federal está junto ao Ministério da Agricultura, através do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, ao qual cabe a inspeção dos produtos de origem animal durante seu abate e processamento de produtos derivados da carne a fim de minimizar os eventos que possam acontecer vindo de um animal portador de alguma afecção ou até mesmo prevenir possíveis falhas durante toda cadeia do abate e processamento (SPERS, 2003).

A qualidade em geral e os atributos de segurança do alimento, são importantes elementos para a tomada de decisão dos consumidores, para as estratégias privadas e para as políticas públicas. A implantação de programas como APPCC e PPHO tem sido realizado visando atender a entrega de produtos com qualidade para o consumidor (BRASIL, 1998 e 2003).

Um dos fatores de vital importância para definir a qualidade de um alimento, refere-se às suas características microbiológicas. A avaliação da qualidade microbiológica das carnes está baseada em parâmetros higiênicos e sanitários, os quais permitem uma avaliação global da matéria-prima usada, da higiene e limpeza durante o processo e da provável vida útil do produto final. Os parâmetros de avaliação sanitária já têm relação direta com a presença de contaminantes microbianos potencialmente patógenos, sendo estes estabelecidos através de legislações (BRASIL, 2001 e 2003).

A segurança do alimento vem sendo objeto de interesse por parte de diversos agentes econômicos e dos consumidores, sendo que a segurança do alimento possui enfoque qualitativo, referente à garantia da qualidade de um produto, permitindo ao consumidor adquirir um alimento com atributos de qualidade que sejam do seu interesse, entre os quais, os atributos ligados à sua saúde (SPERS, 2003).

Durante a vida, os tecidos animais sadios apresentam-se praticamente estéreis e as defesas naturais contrabalançam os efeitos do meio ambiente, incluindo a defesa contra o ataque de microrganismo. Os tecidos de animais saudáveis, exceto a superfície externa, o trato gastrointestinal e as vias respiratórias, contém poucos microrganismos graças aos mecanismos de defesa que controlam com eficiência a multiplicação dos agentes infecciosos em animais vivos (RIEDEL, 1992).

Porém, por ocasião do abate, a carne pode ser contaminada em contato com o pêlo, pele, cascos, conteúdo do estômago e vísceras, equipamentos e utensílios utilizados no abate, mãos e vestuários do pessoal envolvido no processo e água utilizada para lavagem de carcaças (ASLAM et al., 2004, HEUVELINK et al., 2001, McEVOY et al, 2003).

Sabe-se que a carne, mesmo que seja obtida de animais sadios, contamina-se desde a sangria, passando por toda a tecnologia de abate, bem como nos açougues, feiras livres e supermercados, quando, então, chega à mesa do consumidor. E nesta cadeia pode haver pouca atenção referente à higiene e controle de temperatura (LÁZARO et al., 1999).

A contaminação microbiana dos tecidos destinados à produção de carne é indesejável, porém esta é uma consequência inevitável do processo pelos quais os animais vivos são convertidos em carne para o consumo humano. A carne fresca constitui-se num substrato, com condições ótimas para o crescimento de muitos microrganismos, devido à sua umidade, pH, riqueza de compostos nutrientes e minerais, além de fatores de crescimento. Portanto, a maioria das contaminações microbianas pode proliferar rapidamente se as condições, principalmente, de temperatura e atmosfera gasosa, forem favoráveis. Este crescimento bacteriano poderá causar uma deterioração no produto e, de acordo com o microrganismo presente, poderá causar risco à saúde (GERMANO & GERMANO, 2003).

Sabendo-se que está exposta a contaminação microbiana desde a sangria até o ato do consumo acaba sendo envolvida na disseminação de patógenos causadores de enfermidades no homem, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp e *Shigella* spp, sendo que estas podem ser severas e estes patógenos podem estar naturalmente nos animais (BOPP et al., 2003, PABST et al., 2003, WINOKUR et al., 2001, ZWEIFEL et al., 2004).

Nos alimentos, em geral, não deveriam ser encontrados microrganismos que pudessem comprometer a qualidade microbiológica dos alimentos para que estes não causassem danos à saúde dos consumidores (OLIVEIRA et al, 2002).

Em todas as etapas do processamento da carne, esta é manipulada por trabalhadores que, por falta de orientação ou negligência, colaboram para a baixa qualidade do produto. Quando portadores de enfermidades acabam transmitindo as mesmas para os alimentos (LOGUERCIO et al., 2002).

Carne moída é o produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares bovinas. É uma forma comum e importante na comercialização da carne bovina em nível de varejo, pois constitui fonte de proteína de boa qualidade, é mais acessível à faixa da população com menor poder aquisitivo e pode ser utilizada em refeições, de maneiras variadas e práticas. Sendo reconhecida como fonte primária de infecção quando não manipulada adequadamente (BRASIL, 2003).

Os microrganismos superficiais estão, portanto, distribuídos desigualmente por toda a carne moída e podem produzir contaminações posteriores durante o processo,

causando surtos de toxinfecções alimentares com conseqüências graves à saúde dos seres humanos. A contaminação microbiana pode reduzir a vida útil da carne moída bem como representar risco à saúde do consumidor (BERNARDI et al., 2004).

Com isso, a qualidade e microbiota encontrada na carne moída dependerá da higiene e manipulação que sofre em todos estes passos, do processo de moagem que passar, da embalagem usada no seu acondicionamento e estocagem do produto final pelo consumidor. Em adição, deve ser ressaltado também o aspecto qualitativo microbiano, uma vez que o produto sofre manipulação por diferentes pessoas e em situações e lugares diferentes (BLANCO et al., 2004).

Essa contaminação se dá, inclusive, por enterobactérias, que podem causar distúrbios gastrointestinais agudos, como diarréia, vômito, dores abdominais e desconforto. Podem ocorrer possíveis surtos de doenças, que trazem danos sérios à saúde da população e, conseqüentemente, prejuízos econômicos (BRETT et al, 2003, DOMINGUE et al, 2003, FRIEDRICH et al, 2003, GIAMMANCO et al, 2002 , OLIVEIRA et al., 2002).

A loja varejista é o último elo numa cadeia comercial entre o produtor e o consumidor final dos alimentos e representa o ponto extremo em que o controle deve ser aplicado realisticamente ao manuseio e armazenamento do produto. Portanto, o varejista tem a especial responsabilidade de garantir que no ponto de venda não aumentem os riscos ligados aos alimentos (SÃO PAULO, 1978).

Algumas vezes estas carnes podem ser encontradas congeladas nos estabelecimentos comerciais. Mas as carnes que se congelam estão expostas aos mesmos riscos de contaminação e multiplicação de microrganismos que as demais carnes. Se o descongelamento da carne ocorrer de forma lenta sob temperatura controlada é possível diminuir o risco da multiplicação microbiana. Se este descongelamento ocorrer sem controle algum de temperatura, sendo mantido em temperatura ambiente, isto favorece que a superfície externa se descongele mais rapidamente permitindo que os microrganismos que aí estejam presentes se multipliquem (GERMANO & GERMANO, 2003).

De uma maneira generalizada, é proibido moer carne previamente para depois expô-la a venda, e estas constantemente apresentam maior número de microrganismos que as carnes não picadas. Esta situação deve-se a fatores como: as carnes moídas comercializadas em estabelecimentos públicos são constituídas na maioria das vezes por sobras de diversas peças de carne *in natura* e, portanto, correspondem a porções já manipuladas; e também apresenta uma área superficial maior, o que em parte explica o aumento de sua flora. Outro fator determinante no aumento da carga microbiana está relacionado ao maquinário e aos demais utensílios que em alguns locais de venda não são dados os cuidados necessários para higiene e sanitização dos mesmos, o que seria necessário para prevenir recontaminações (JAY, 2000; RIEDEL, 1992, SÃO PAULO, 1978).

Podem ser detectados na análise de alimentos os coliformes totais e os fecais. PELCZAR Jr et al. (1996), cita que o índice de coliformes é utilizado para avaliar as condições higiênicas, sendo que altas contagens significam contaminação no manuseio, na limpeza e sanitizações deficientes. Conforme os valores encontrados, isto indica falta de higiene, controle de qualidade e controle sanitário.

A presença de bactérias do grupo coliformes fecais nos alimentos é interpretada como indicador de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Este índice de coliformes fecais é empregado tendo em vista que a população deste grupo é constituída de uma alta proporção de *E. coli*. Sua presença indica a possibilidade de ocorrerem outros microrganismos entéricos na amostra. O índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições higiênicas, sendo que altas contagens significam contaminação pós-processamento, limpeza e sanificação deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

O uso de *E. coli* como um indicador de contaminação de origem fecal presente em água foi proposto em 1892, uma vez que esse microrganismo é encontrado no conteúdo intestinal do homem e animais de sangue quente (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Trabalho realizado por OLIVEIRA et al. (1999) mostra a presença de coliforme fecais em hambúrguer de frango, denunciando assim características higiênicas sanitárias inadequadas quanto à elaboração, transporte e/ou comercialização do referido produto.

No trabalho de FERREIRA & SOBRINHO (2003) foram encontrados altos índices de coliformes totais e coliformes fecais. Um fator muito importante para o elevado índice de coliformes totais da carne bovina, é provavelmente devido à falta de refrigeração do produto, porém, em alguns casos, durante a refrigeração, há inibição do crescimento dos microrganismos já existentes, porém não a eliminação destes.

Os alimentos crus, tal como são recebidos nas cozinhas, podem albergar grande variedade de microrganismos patogênicos. Matérias-primas de origem clandestina como carnes não inspecionadas são responsáveis pela veiculação das mais variadas espécies de microrganismos, muitos deles patogênicos para o homem. Dentre os alimentos que mais freqüentemente aparecem relacionados a surtos de toxinfecção alimentares destacam-se as carnes bovinas e de frango, responsáveis pela veiculação, principalmente de clostrídios, estafilococos e enterobactérias (DOYLE & SCHOENI, 1987, DOYLE, 1991, GERMANO & GERMANO, 2003, PESSANHA & GONTIJO FILHO, 2001).

Para que um patógeno possa provocar toxinfecção é necessário que ele atinja concentração elevada no alimento, ou produza toxinas durante sua multiplicação, o que poderá ocorrer nos alimentos (HOFFMAN et al., 2002).

Há autores, como ELLEBRACHT et al. (1999), que propõem o tratamento da carne moída com água quente ou adicionada de ácido para diminuir a carga microbiana presente.

Os métodos de calor visam à eliminação de microrganismos inconvenientes e, quando isso não é possível, eles procuram impedir ou retardar o seu crescimento. De modo geral, a aplicação dos processos de conservação pelo calor está condicionada ao grau adequado de temperatura e ao tempo de sua exposição e às diferentes características dos produtos a serem tratados (GERMANO & GERMANO, 2003).

SILVA et al. (2002) analisando carne de frango refrigerada constataram a incidência de *E. coli* em 95% das amostras, sendo que há algumas cepas que

produzem toxinas. ARTHUR et al. (2002) encontraram toxinas elaboradas por cepas de *Escherichia coli* isoladas de carcaças bovinas de indústrias comerciais. Sua presença indica contaminação fecal direta ou indireta, sugerindo que outros microrganismos patogênicos podem estar presentes. Outro fator a ser considerado é que os microrganismos pesquisados são mesófilos, o que representa a manutenção do produto em temperaturas inadequadas à sua conservação em uma ou mais etapas do seu processamento ou armazenamento.

Se o processamento de alimento de origem animal for bem conduzido, os níveis de contaminação microbiana serão baixos, uma vez que a qualidade final dependerá da extensão da contaminação/recontaminação das espécies bacterianas presentes e da temperatura de armazenamento (REINDERS et al., 2001).

2.3. Riscos de Doenças Veiculadas por Alimentos

As doenças veiculadas por alimentos, constituem-se hoje em um dos problemas de saúde mais disseminados e uma importante causa de redução da produtividade econômica. A importância destas doenças como um problema real de saúde da população é, no geral, subestimada porque a verdadeira incidência é de difícil avaliação e a severidade das conseqüências à saúde ou à economia não são devidamente analisadas (TESSARI et al., 2003).

Os alimentos destinados ao consumo humano são produzidos, manipulados e consumidos em um meio ambiente contaminado com uma grande variedade e quantidade de microrganismos e parasitos. Em conseqüência desta situação, o homem ingere diariamente microrganismos e, às vezes, parasitos juntamente com os alimentos, dentre estes, certamente, também patogênicos (RIEDEL, 1992).

As toxinfecções alimentares afetam anualmente milhões de pessoas no mundo todo e a inocuidade tornou-se um importante critério de julgamento no comércio internacional de alimentos. As doenças transmitidas por alimentos são causadas

principalmente por compostos químicos, vírus, parasitas e bactérias (DE MARTINIS, 2004, UNGAR et al., 1992).

Os contaminantes dos alimentos possuem 2 origens: endógena e exógena. Os contaminantes de origem endógena já se encontram nos alimentos antes de sua obtenção e os de origem exógena são contaminantes adicionados nos alimentos durante sua manipulação (UNGAR et al., 1992).

São importantes causas de infecções e intoxicações alimentares os contaminantes de origem exógenas onde estão contidos os microrganismos como *E. coli*. Portanto, a grande preocupação é impedir que estes microrganismos sejam adicionados à matéria-prima e se multipliquem (GERMANO & GERMANO, 2003).

Os problemas microbiológicos fundamentais são: contaminação microbiana inicial dos alimentos que entrem nos sistemas do mercado, microrganismos acrescentados aos alimentos por contaminação com outros alimentos, manipuladores de alimentos, superfície de contato dos alimentos, multiplicação de microrganismos devido à prática de manuseio inadequado, crescimento de microrganismo em alimentos perecíveis como a carne, mesmo quando mantidas em temperaturas adequadas (BLANCO et al, 2004, DOYLE & SCHOENI, 1987, DOYLE, 1991, SIDJABAT-TAMBUNAN et al., 1998).

Apesar da presença de microrganismos patogênicos ser possível, a microflora deterioradora é predominante na carne e seus derivados. Dentre as bactérias associadas à deterioração de produtos cárneos refrigerados destacam-se as pertencentes a família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* sp. A presença dessas bactérias em número elevado diminui o período de vida de prateleira do produto, provocando prejuízos aos comerciantes (GERMANO & GERMANO, 2003).

Segundo FRANCO & LANDGRAF (2003), a presença do número elevado de enterobactérias, em alimentos de origem animal, pode indicar a manipulação sem cuidado de higiene e/ou armazenamento inadequado, bem como contaminação fecal. A pesquisa de coliformes fecais ou de *E. coli* nos alimentos nos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e é a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos.

As principais doenças de origem microbiana transmitidas por alimentos possuem como características comuns um curto período de incubação e um quadro clínico gastrointestinal manifestado por diarreia, náuseas, vômitos e dor abdominal, acompanhado ou não de febre. Normalmente, podem ser de curta ou longa duração, podendo variar com recuperação total do paciente ou complicações graves, conduzindo até mesmo à morte (CDC, 2003, DOMINGUE et al., 2003, GERMANO & GERMANO, 2003).

Deve-se enfatizar a importância destes quadros em populações carentes e desnutridas, que vivem em condições higiênico-sanitárias precárias muitas vezes consideradas normais para estas que aí vivem. São condições precárias de saneamento básico, as quais facilitam a contaminação de água e dos alimentos. A desnutrição, associada ou não a uma doença transmitida por alimentos, deteriora acentuadamente a qualidade de vida (CDC, 2003).

As incidências acontecem onde as condições sanitárias são precárias e a contaminação dos suprimentos de água é uma constante. Com isto, o homem após sofrer sucessivas infecções por esta e não passar por tratamento adequado acaba sendo um portador de cepas patogênicas, propiciando a contaminação do ambiente e o contágio de outras pessoas (GERMANO & GERMANO, 2003).

A manutenção da qualidade microbiológica do sistema de abastecimento de água usada para beber, recreação e pescado é imperativo, como a contaminação destes sistemas pode haver alto risco para a saúde pública bem como resultar em uma significativa perda econômica. A contaminação da água com fezes humanas, geralmente, é tida como grande risco à saúde humana, por conterem patógenos entérico específicos. Animais também podem servir como reservatório para uma variedade de patógenos entéricos, como a *E. coli*, sendo esta problemática de vários anos. Portanto, os patógenos não se limitam apenas aos humanos, eles se estendem também aos animais (RANDALL et al., 1999, SAVAGE et al., 1973).

Falhas no sistema de abastecimento de água podem levar a enfermidades severas como o ocorrido nos Estados Unidos em 1999, onde houve um surto envolvendo 775 pacientes, sendo que destes pacientes foram isolados *E. coli* O₁₅₇:H₇

de 128 pacientes com cepas produtoras de shiga toxina, sendo confirmado o mesmo isolamento diretamente da água do sistema de abastecimento (BOPP et al., 2003).

De acordo com registros da Organização Mundial da Saúde (OMS) (OPAS, 2006), são detectados anualmente, nos países em desenvolvimento, mais de 1 bilhão de casos de diarreia aguda em crianças menores de 5 anos, das quais 5 milhões chegam ao óbito. A contaminação bacteriana dos alimentos é uma das causas representativas destes casos.

Estes dados puderam ser observados por PABST et al. (2003), onde crianças menores de 5 anos de idade foram mais atingidas por infecções provocadas por *E. coli* enteroagregativa do que as maiores. As crianças apresentaram sintomas como diarreia e vômito. Foi possível verificar também que pessoas que se deslocam de seus países de origem em viagens são acometidas por enfermidades provavelmente devido a falhas no saneamento dos países por onde estiveram.

Em países em desenvolvimento, as doenças diarreicas são prevalentes e constituem uma importante causa de morbidade e mortalidade entre as crianças pequenas. Pesquisadores calculam que todos os anos, de 1 milhão a 100 milhões de indivíduos contraem doenças (infecções e intoxicações) decorrentes de alimentos, através do consumo de refeições e água de bebida (OPAS, 2006).

Um estudo realizado por KHAN et al. (2002) mostra a distribuição de *E. coli* envolvida desde enfermidades em humanos provocando diarreia, presença em animais na carne, o que demonstra ligação nos diversos níveis observando a cadeia epidemiológica em que esta bactéria está envolvida. Neste estudo foi possível observar STEC em 18% das amostras de fezes de bovinos aparentemente saudáveis, em 50% da carne de abatedouro, em 1,4% das fezes com presença de sangue e em 0,6% das fezes aquosas de pacientes com diarreia.

Em algumas propriedades rurais, sendo o início da cadeia epidemiológica, costuma-se fazer a reciclagem de resíduos sólidos e compostos. Existe uma certa distribuição de microrganismos como *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* nestas propriedades. A realização de compostagem para reduzir os níveis destes microrganismos deve ser realizada de maneira cuidadosa e monitorada, pois se forem

dadas condições próprias para o desenvolvimento dos mesmos, estes crescerão em níveis exorbitantes podendo ser disseminado na propriedade, nos alimentos ali produzidos e contaminando a água (CARROLL & JASPER, 1978, GIAMMANCO et al., 2002).

Pode-se considerar como vias de transmissão os alimentos de origem animal, vegetal e a água. Sendo assim, qualquer alimento exposto a contaminação fecal, seja através da água de preparo de alimentos ou manipuladores infectados é capaz de veicular *E. coli* (BOPP et al., 2003, GIAMMANCO et al., 2002, JENKINS et al., 2002, RANDALL et al., 1999).

Assim sendo, o conhecimento das fontes de infecção e veículos de disseminação de enterobactérias é, portanto, básico em Saúde Pública. Deste modo, a investigação de enterobactérias em manipuladores de alimentos, assim como em fontes animais, tem especial interesse já que esta família bacteriana alberga tanto microrganismos clássicos de contaminação fecal como germes patogênicos produtores de toxinfecção alimentar (ASLAM et al, 2004, GERMANO & GERMANO, 2003, LÁZARO et al., 1999, REINDERS et al., 2001, RIBEIRO et al., 2000, SCOTT, 2002).

Quando o alimento passar por processo de industrialização, possíveis contaminantes de manipulação e transporte anterior poderão ser eliminados por processos de tratamento, mas isto não ocorre quando a venda ao consumidor final é do alimento *in natura*. Sendo que, máquinas em mau estado de conservação, higiene deficiente, manipulação e manipuladores de baixo nível técnico ou sem treinamento, utensílios contaminados, água sem tratamento ou controle de acordo com os padrões de potabilidade constituem causa de má qualidade de um alimento e grande potencial de risco à saúde pública (GERMANO & GERMANO, 2003).

A maioria dos casos de doenças, de origem microbiana, transmitidas por alimentos deve-se à manipulação inadequada. Dentre as causas mais comuns encontram-se a má utilização da temperatura no preparo e conservação dos alimentos, a contaminação cruzada, a higiene pessoal deficiente, a preparação dos alimentos com muita antecedência ao seu consumo, a limpeza imprópria de equipamentos e utensílios

e o contato de manipuladores infectados com alimentos já preparados (ASLAM et al., 2004, COSTA et al., 2000, REINDERS et al., 2001, WARRINER et al., 2002).

O desenvolvimento microbiano, além de outros fatores, somente é possível em suas faixas preferenciais de temperatura, observando-se que cada grupo microbiano tem sua temperatura ótima de crescimento (GERMANO & GERMANO, 2003).

A temperatura dos alimentos é um dos fatores mais importantes para assegurar a qualidade sanitária dos alimentos e a sua acertabilidade, sendo um dos mais importantes pontos críticos e um dos únicos meios que se pode utilizar eficientemente no combate a microrganismos. Para controlar o perigo pode ser usado o binômio tempo/temperatura para alimentos processados termicamente; temperatura durante a distribuição de produtos que necessitam de manutenção a quente (PEREIRA & MACULEVICIUS, 1999).

Pelas abordagens mencionadas, fica explícito que existe uma preocupação no sentido da realização de estudos relacionados com a microbiologia dos alimentos, primeiro, em virtude do enorme número de doenças que os produtos cárneos podem veicular; segundo, pelas grandes perdas econômicas que tais contaminações podem proporcionar, trazendo substanciais prejuízos à população e à nação (OLIVEIRA et al, 2002).

A carne bovina, quando consumida crua ou insuficientemente cozida, constitui uma fonte de contaminação, pois os animais podem ser os portadores da contaminação. Pode haver a contaminação de carcaças durante o abate por falha durante o mesmo, falta de higiene e por contaminação pelo manipulador. Essas peças de carne chegam ao consumidor e o agente poderá não só estar presente na superfície da peça, mas também ir para sua região interna estando ela moída ou como fruto de produtos fabricados como hambúrguer. Dessa forma, permite que o agente permaneça no meio, facilitando sua disseminação (CERQUEIRA et al., 1999, GERMANO & GERMANO, 2003, MIDGLEY & DESMARCHELIER, 2001, MORA et al., 2005).

Ao lado dos microrganismos envolvidos em processos de deterioração, existem diversas espécies patogênicas que podem contaminar os alimentos, principalmente os produtos de origem animal. Dentre esses microrganismos encontram-se *Salmonella*

spp, *Shigella* spp e *E. coli*. As formas virulentas desses microrganismos podem causar doenças agudas que se manifestam como diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos e febre, podendo provocar a morte de crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos, ou doenças crônicas (PABST et al., 2003, SILVA et al., 2002, WINOKUR et al., 2001, ZWEIFEL et al., 2004).

Algumas bactérias secretam substâncias que contribuem para a sua virulência. Alguns microrganismos produzem substâncias prejudiciais conhecidas como toxinas. A capacidade de um microrganismo de produzir uma toxina – uma substância que tem efeito prejudicial sobre as células e os tecidos do hospedeiro - e a potência desta toxina são fatores importantes na habilidade do microrganismo em causar doença (BLANCO et al., 2003, PELCZAR Jr et al., 1996).

Existem cepas de *Escherichia coli* que são produtoras de shiga toxina que podem causar intoxicação alimentar e doenças severas. Estas estão envolvidas em colites hemorrágicas ou síndrome urêmica hemolítica, sendo causa de falência renal em humanos (BRETT et al., 2003, KHAN et al., 2002, RUIZ et al., 2002). Estão envolvidas também em enfermidades em animais causando lesões como no trabalho de DONOHUE-ROLFE et al. (2000) que demonstram lesões neurotrópicas produzidas por esta toxina.

No estado de São Paulo, os surtos registrados envolvendo Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) entre os anos de 1998 e 2002 mostram um total de 21 casos, sendo confirmados 20 casos, aos quais foram considerados por possuir histórico alimentar com diarreia com sangue ou não precedendo o quadro e/ou isolamento de *E. coli* em coprocultura. Desse total, a faixa etária mais envolvida foram crianças menores de 1 ano de idade (11 crianças). Do total de 20 casos, 15 apresentaram diarreia, 1 sem diarreia e 1 sem informação. Dentre os 20 casos de HUS, em 7 não foram coletadas amostras de fezes para análise, em 9 foram coletadas fezes sendo 2 com resultados positivos para *E. coli* sem sorotipagem e 7 negativos. A maioria dos surtos ocorreram no ano de 1999 envolvendo 9 casos (CVE, 2006).

Sendo que no ano de 2003, foram notificados no estado de São Paulo 71 surtos de doenças transmitidas por alimentos e águas. Deste total 56 casos envolviam carne

e/ou derivados, 40 casos foram atribuídos a carne e sua participação em alimentos, 2 hambúrguer, 1 salsicha, 2 cachorro quente, 4 carne moída, 1 lingüiça, 2 fígado, 1 mortadela, 1 esfiha+quibe, 1 rocambole de carne, 1 bolinho de carne (CVE, 2006).

No mesmo ano, foram atribuídos aos surtos o envolvimento de *E. coli* e/ou coliformes em 17 surtos, tendo um envolvimento de 2712 pessoas. Destes, apenas 1 estava envolvido *E.coli* e *Clostridium* sulfito redutor, 1 por *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positivo, 5 por Coliforme, 1 por VHA (Vírus da Hepatite tipo A) e coliformes, 1 por *E. coli*, *Shigella* e *Enterobacter*, 1 por *Giardia* e *E. coli* (prováveis), 1 por *Salmonella* sp e *E.coli* invasora, 1 por *E.coli*, 1 por *E. coli* enteroinvasiva tipo 5, 1 por *E. coli* enteroinvasora V e VI, 1 por Rotavírus, *E. coli* e *Candida albicans*, 1 por *E. coli* 028-1. Desse total 6 possuíam o envolvimento de carne. Quanto à carne moída, esteve envolvida em 1 surto com o isolamento de *E. coli* 028-1 atingindo 24 pessoas (CVE, 2006).

A prevenção e o controle dependem obrigatoriamente da observação rigorosa dos preceitos de higiene desde o abate até a conservação da carne na casa do consumidor, pelos cuidados da manipulação de produtos crus, higienização de instalações e equipamentos, tratamento térmico adequado e a manutenção dos produtos sob refrigeração durante o tempo adequado (ELDER et al., 2000, GERMANO & GERMANO, 2003, REINDERS et al., 2001).

2.4. O Gênero *Escherichia*

O envolvimento de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em enfermidades veiculadas por alimentos, ocorre por causa de um saneamento deficiente, de asseio pessoal inadequado e por contaminação cruzada das superfícies de trabalho e utensílios. A presença de tais bactérias representa um perigo que deve ser eliminado ou controlado mediante práticas higiênicas corretas que impeçam o crescimento de patógenos (BOPP et al., 2003, HEUVELINK et al., 2001).

A *E. coli* pertence ao grupo de bactérias coliformes fecais. Esta bactéria possui como habitat o trato gastrointestinal do homem e dos animais, podendo também levar ao desenvolvimento de enfermidades (MAINIL et al., 1999, RIBEIRO et al., 2000, WASTESON et al., 2005, WHITE et al., 2000).

Na análise de alimentos de rotina são realizados testes incluindo a pesquisa do grupo coliformes fecais, onde estes microrganismos estão presentes em altas proporções indicando a possibilidade de ocorrência de outros microrganismos entéricos. Havendo a positividade para este grupo, isto significa que houve contaminação durante o processamento, limpeza deficiente, tratamento térmico inadequado ou multiplicação do agente durante o processamento e estocagem (LAGAGGIO et al., 2002, SILVA et al., 2002, OLIVEIRA et al., 2002).

A presença de *E. coli* em alimentos deve ser considerada quanto à origem fecal da contaminação e a patogenicidade comprovada deste microrganismo para o homem, particularmente de linhagens classificadas atualmente como emergentes. Sua distribuição é mundial sendo estudada em diversos países como Inglaterra (LIEBANA et al., 2003), Estados Unidos (BOPP et al., 2003), Canadá (DOYLE & SCHOENI, 1987), Brasil (BERNARDI et al., 2004), Itália (BONARDI et al., 1999, PAGANI et al., 2003).

A toxinfecção causada por *E. coli* leva a gastroenterite, cujo o principal sintoma é a diarreia. É bem conhecida em *E. coli* a produção de toxinas que levam ao desenvolvimento de enfermidades em humanos e em animais (BRETT et al., 2003, DOMINGUE et al., 2003, FRIEDRICH et al., 2003, GIAMMANCO et al., 2002, RICHARDS et al., 1998).

Esta bactéria pode ser transmitida por produtos cárneos, pois a mesma faz parte da microbiota do trato gastrointestinal sendo isolada das fezes de animais de consumo. (ADWAN & ADWAN, 2004, BROOKS et al., 2001, MEICHTRI et al., 2004).

A presença de *E. coli* indica a qualidade microbiológica da carne, desde seu abate até a comercialização, dependendo de uma série de cuidados higiênico-sanitários. A carne, no comércio varejista, sofre processo de corte e moagem, podendo aumentar ainda mais o seu nível de contaminação. Ela é mantida em vitrines e algumas vezes em temperatura inadequada. Essas diferentes etapas podem promover a

contaminação do produto por diferentes microrganismos existindo grande chance desses se multiplicarem, deteriorar o produto, liberar toxinas e colocar em risco a saúde do consumidor (ASLAM et al., 2004, FERREIRA & SOBRINHO, 2003, JAY, 2000, REINDERS et al., 2001).

Quando o alimento contaminado é assim consumido, o desenvolvimento de enfermidade dependerá de vários fatores como susceptibilidade individual, a quantidade de alimento consumido, entre outros. As doses infectantes de *E. coli*, que permitem a colonização do microrganismo ao nível das células intestinais dos indivíduos infectados e a conseqüente produção de toxina também variam de acordo com o tipo de cepa considerada. Conforme PABST et al. (2003) foi possível observar que crianças foram mais acometidas por cepas de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e estas estavam relacionadas a histórico recente de viagem.

São conhecidas 4 classes enterovirulentas do patógeno, responsáveis por quadros de gastroenterites no homem: enteropatogênica (EPEC) (BERNARDI et al., 2004, GHILARDI, 2000), enterotoxigênica (ETEC) (EKLUND et al., 2002), enteroinvasiva (EIEC) (PRATA, 1999), enterohemorrágica (EHEC) (MAKINO et al., 2003). São conhecidas outras duas classes, a difusamente aderente (DAEC) (WANG et al., 2002) e a enteroagregativa (EaggEC) (GHILARDI, 2000, PABST et al., 2003, PELCZAR Jr et al, 1996).

Estudos relacionados com fatores de virulência, sintomatologia e epidemiologia demonstraram que sorogrupos do grupo EPEC (*E. coli* enteropatogênica) são heterogêneos e algumas linhagens apresentam expressivo potencial patogênico, podendo corresponder às classes EHEC, ETEC, EIEC, EaggEC e DAEC (*E. coli* difuso aderente). Demonstrando assim que os sorogrupos são bastante heterogêneos com relação aos mecanismos de virulência, uma vez que eles podem apresentar as características de virulência de qualquer uma das categorias de *E. coli* diarreiogênicas descritas (GHILARDI, 2000). Portanto, a presença de linhagens de EPEC em alimentos deve ser considerada um alerta em nível de saúde pública. Ressalta-se atenção quando nos reportamos particularmente para áreas de menor poder sócio-econômica.

Segundo GERMANO & GERMANO (2003), nas infecções enterohemorrágica e enteroinvasivas a dose infectante é de apenas 10 células, semelhante ao que acontece em infecções causadas pela *Shigella* sp. Por outro lado, para haver manifestação clínica da forma enterotoxigênica estima-se que haja necessidade de 100 milhões a 10 bilhões de bactérias.

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) está relacionada aos primeiros surtos envolvendo principalmente o sorotipo O₁₅₇:H₇, sendo sua identificação como patógeno em 1982 como causa de uma série de surtos especialmente no Canadá, Japão e Estados Unidos (KARMALI, 1989 citado por BLANCO et al., 2003, PATON & PATON, 1998).

E. coli enterohemorrágica (EHEC), a causa de colites hemorrágicas e síndrome urêmica hemolítica (HUS), causa de falência renal aguda, é marcada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e disfunção renal. Há envolvimento de vários sorotipos e não somente o sorotipo O₁₅₇:H₇ (BRETT et al., 2003, DOMINGUE et al., 2003, FRIEDRICH et al., 2003, GIAMMANCO et al., 2002,). DONOHUE-ROLFE et al. (2000) demonstraram que este agente pode levar a lesões neurológicas, sendo este demonstrado em animais. Estas lesões são provocadas por estas cepas pela produção de 2 toxinas: shiga toxina 1 (stx1) e shiga toxina 2 (stx2). Pode haver a produção de uma única toxina ou a produção das duas toxinas (IRINO et al., 2005).

Trabalhos como de BLANCO et al. (2003) tem mostrado que os animais são os maiores reservatórios de *E. coli* shigatoxigênica, sendo também um patógeno para humanos, e sua transmissão pode ocorrer através do consumo de carne e outros produtos derivados.

Existem cepas que são necrotoxigênicas, como demonstrado por MAINIL et al. (1999), sendo isoladas de animais e de humanos carregando genes de adesão e outras propriedades associadas à virulência.

Apesar de toda preocupação referente aos fatores de virulência que cepas de *E. coli* apresentam, alguns trabalhos tem demonstrado que certas cepas não os possuem como em LIPMAN et al. (1995) em estudo realizado com cepas de *E. coli* isoladas de casos de mastite bovina onde nenhuma cepa apresentou enterotoxinas e gene para

verotoxina. Assim também DONTOROU et al. (2003) ao analisarem vários alimentos não detectaram tais cepas nas amostras de carne moída.

Outro fator de virulência é a presença do gene *eae* que determina a produção da proteína intimina, que está relacionada à capacidade de aderência que a bactéria tem à célula em nível intestinal. Este fator aparece envolvido em casos onde cepas de *E. coli* foram investigadas estando associado em pacientes com síndrome urêmica hemolítica e também em portadores assintomáticos (FRIEDRICH et al., 2003).

GALLAND et al. (2001) identificaram o gene *eaeA* em *E. coli* O₁₅₇:H₇ sendo este estudo realizado em carne bovina. Em contrapartida, no trabalho realizado por DOMINGUE et al. (2003) as cepas de *E. coli* produtoras de shiga toxina obtidas de pacientes com síndrome urêmica hemolítica e colite hemorrágica não possuíam o gene *eae*, mostrando que este gene não é um fator determinante no desenvolvimento da enfermidade.

2.5. Higiene de Equipamentos

O controle estrito de todas as operações é fundamental para minimizar a contaminação microbiana das carcaças, com a finalidade de evitar riscos à saúde humana e garantir a qualidade das carnes produzidas. É possível observar redução na taxa de contaminação quando são aplicados procedimentos sanitários durante o processamento, tais como a aplicação de Boas Práticas de Manipulação e do plano APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) (ELDER et al., 2000, REINDERS et al., 2001).

Os equipamentos utilizados no preparo e comercialização da carne bovina moída devem apresentar boas condições higiênico-sanitárias para evitar qualquer tipo de contaminação ao entrar em contato com o alimento. A aplicação de procedimentos operacionais padronizados são determinantes, pois havendo um controle de todas as etapas de higienização pelo estabelecimento comercial isto determinará um menor risco de contaminação do alimento (BRASIL, 2002).

LOGUERCIO et al. (2002) puderam observar que os equipamentos utilizados no preparo e comercialização da carne moída apresentavam-se em condições insatisfatórias de higiene, tornando o produto em contato com este equipamento impróprio para o consumo.

ASLAM et al. (2004) demonstraram que em indústria de carne embalada a contaminação microbiana pode ocorrer depois do toalete da carcaça, sugerindo atenção na separação das carcaças durante o toalete e mostrando que higiene e limpeza do ambiente e equipamentos são fundamentais para manutenção da qualidade sanitária do produto.

Deficiências na construção também podem ser fatores determinantes na contaminação cruzada de produtos, como citada por HEUVELINK et al. (2001) que puderam observar a contaminação cruzada de carcaças através do contato direto devido falhas na construção permitindo o contato carcaça-carcaça e destas com o piso e parede. Nestes casos, havendo falha na limpeza e desinfecção, haverá contaminação do produto. Este mesmo trabalho demonstra que em 39% dos abatedouros inspecionados a limpeza e desinfecção eram inadequados. E na inspeção visual puderam detectar que em 11 dos 27 estabelecimentos visitados, mais de 10% das carcaças estavam contaminadas visualmente. Após um trabalho conduzido, visando reduzir esta contaminação, pôde ser observado uma redução nestes valores de 22% para 7% da contaminação das carcaças quando empregadas práticas de higiene.

A limpeza e desinfecção de utensílios, equipamentos e superfície que entram em contato com os alimentos *in natura*, constitui ponto importante para a veiculação de microrganismos patogênicos e deve ser dada muita atenção a este fato (BRASIL, 2003). A promiscuidade de utensílios e recipientes propicia a disseminação de agentes das toxinfecções, bem como a contaminação dos próprios manipuladores. Por outro lado, os manipuladores podem contaminar os alimentos ao embalá-los (GERMANO & GERMANO, 2003).

A limpeza das instalações deve ser feita impreterivelmente antes e após o término das atividades e sempre que necessário. Toda instalação, equipamento e utensílios devem ser mantidos em bom estado de conservação e funcionamento. A

freqüência de limpeza e desinfecção deve ser sempre que as circunstâncias assim o exigir, imediatamente após o término do trabalho e quantas vezes for conveniente (BRASIL, 1997).

2.6. Manipulação de Alimentos

As pessoas que manipulam os alimentos desempenham uma função importante na preservação da higiene dos mesmos. O estado de saúde das pessoas que trabalham em estabelecimentos de produtos alimentícios, assim como suas práticas higiênicas influenciam diretamente a qualidade final dos alimentos (LAGAGGIO et al., 2002).

Para efeito da inspeção sanitária de alimentos, qualquer pessoa que entra direta ou indiretamente em contato com substâncias alimentícias é considerada manipulador (RIEDEL, 1992).

A pele possui uma microbiota variada tornando o homem uma fonte de contaminação importante dentro da cadeia alimentar. As pessoas podem ser portadoras de agentes infecciosos devido à falta de higiene, quando acometidas de patologias ou mesmo como portadoras assintomáticas. Ocorrendo falhas durante a manipulação, os microrganismos causadores de doenças aproveitarão todas as ocasiões para determinar o aparecimento de doença no homem (FRIEDRICH et al., 2003, LAGAGGIO et al., 2002, RIEDEL, 1992, WINOKUR et al., 2001).

A superfície das mãos pode apresentar grande número de microrganismos patogênicos ou não, e quando não há uma adequada higienização, durante a manipulação de alimentos podem contaminá-los com microrganismos capazes de acarretar inúmeras enfermidades. Dessa forma, os alimentos consumidos pelo homem, tanto os de origem vegetal como os de origem animal, podem ser contaminados por microrganismos, durante qualquer uma das etapas de produção, manipulação, transporte, armazenamento ou distribuição (BONARDI et al., 1999, GIAMMANCO et al., 2002).

Com isso, a higiene e os hábitos pessoais são imprescindíveis para a obtenção de produtos com qualidade satisfatória, sendo essencial a adoção de práticas adequadas e treinamento de pessoal (LAGAGGIO et al., 2002).

Os manipuladores estão diariamente em estreito contato com muitas pessoas, as quais podem possuir microrganismos causadores de doenças, de forma aparente ou inaparente. Sendo que nem doentes e nem portadores devem freqüentar estabelecimentos de gêneros alimentícios e muito menos trabalhar neles. Todos devem ser capacitados em legislação pertinente a área, segurança do trabalho, legislação sanitária e higiene (RIEDEL, 1992, SÃO PAULO, 2001).

A microbiota das mãos e roupas dos manipuladores pode ser oriunda de solo, água, poeira e outros ambientes. Outra fonte importante são as fossas nasais, a boca e a pele. Em condições muito precárias de higiene também os microrganismos do trato gastrointestinal podem contaminar as mãos dos manipuladores e, conseqüentemente, os alimentos por eles preparados (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

A constatação ou suspeita de que o manipulador apresente alguma enfermidade ou problema de saúde que possa resultar na transmissão de perigos aos alimentos ou mesmo que sejam portadores, deve impedi-lo de entrar em qualquer área de manipulação ou operação com alimentos se existir a probabilidade da contaminação destes e dos equipamentos. Portanto, as pessoas que mantêm contatos com alimentos devem submeter-se aos exames médicos e laboratoriais que avaliem a condição de saúde antes do início de sua atividade e/ou periodicamente, após o início das mesmas (BRASIL, 1997 e 2004, SÃO PAULO, 1999).

Os proprietários devem tomar medidas necessárias para que não se permita a ninguém que se saiba ou que se suspeite que padece ou é vetor de uma enfermidade susceptível de transmitir aos alimentos, ou que apresentem feridas infectadas, infecções cutâneas, chagas ou diarreia, trabalhar em qualquer área de manipulação de alimentos com microrganismos patógenos, até que obtenha alta médica. Sendo assim, toda pessoa que trabalhe em manipulação deve avisar seu estado de saúde (BRASIL, 1997 e 2004, SÃO PAULO, 1999).

Para que um manipulador contamine um alimento, de forma a causar uma enfermidade de origem alimentar, é necessário que uma seqüência de condições seja atendida como: que os microrganismos sejam excretados em quantidade suficiente, passem para as mãos ou partes expostas do corpo e que entrem em contato direto ou indireto com o alimento; que sobrevivam o suficiente para contaminar o alimento; que o alimento contaminado não seja submetido a tratamento capaz de destruir os microrganismos antes de ser consumido; que o número de microrganismos presente constitua dose infectante, ou que o tipo de alimento ou a sua condição de armazenamento permitam que os microrganismos se multipliquem até a dose infectiva, ou produzam toxinas (GERMANO & GERMANO, 2003).

Todos os surtos de origem alimentar causados por *E. coli* são direta ou indiretamente ligados à contaminação fecal humana. Isto significa a provável exposição do alimento à água não tratada e contaminada com esgoto doméstico ou manipulação inadequada (BOPP et al., 2003).

Segundo FRANCO & LANDGRAF (2003), a presença de número elevado de enterobactérias, em alimentos de origem animal, pode indicar a manipulação sem cuidado de higiene e/ou armazenamento inadequado, bem como contaminação fecal.

Os manipuladores, quando manipulam a carne de maneira incorreta, podem contrair enfermidades quando não higienizam suas mãos após a manipulação, pois a carne bovina *in natura* tem sido reconhecida como fonte primária de infecção e quando esta higiene é precária ele pode se contaminar. A higienização do manipulador existe não somente para proteger o alimento, mas também para proteger a saúde do manipulador (LOGUERCIO et al., 2002).

Os manipuladores de alimentos possuem fundamental importância na higiene e sanidade dos mesmos, visto que cabe a eles grande parte do manuseio, tornando-se fonte potencial de contaminação caso ocorram falhas no processo de preparação. Pois, apesar de todos os conhecimentos sobre higiene dos alimentos para a prevenção de enfermidades de origem alimentar, surtos e casos esporádicos ainda continuam a acontecer (CVE, 2006).

Pode-se considerar também como um fator de contaminação dos alimentos a deficiente preparação profissional de alguns manipuladores, dedicados em muitas ocasiões a executar múltiplas tarefas além da manipulação dos alimentos. LAGAGGIO et al. (2002) afirmam que entre as medidas aplicáveis na prevenção de doenças transmitidas por alimentos, a educação e informação em higiene dos alimentos para manipuladores de alimentos é destacada, pois a maioria das pessoas que trabalham na manipulação de alimentos possui uma formação deficiente. Portanto, a metodologia dos programas de treinamento destinados a este público deve considerar suas limitações, a fim de que se atinja o objetivo de compreensão e a mudança de atitude do indivíduo frente ao seu trabalho. Os autores verificaram que após a realização de palestras sobre educação sanitária foi conseguida a redução da contaminação das mãos dos manipuladores de alimentos. Assim, deve ser realizado um monitoramento e capacitação constante mantendo-se um nível adequado de higiene de indivíduos que atuam nos locais de manipulação de alimentos.

Muitas bactérias adquiridas dos alimentos crus, dos dejetos e do ambiente podem ser removidas das mãos através de lavagem correta das mesmas. Para manter-se a segurança alimentar em ambiente de manipulação de alimentos algumas regras devem ser seguidas no processo de higienização das mãos pelos manipuladores (BRASIL, 1997 e 2004, SÃO PAULO, 1999).

É bom destacar que todos estes esforços são para minimizar possíveis contaminantes que possam estar presentes nas mãos dos manipuladores (LAZARO et al., 1999).

2.7. Antimicrobianos

Os antibióticos constituem uma classe especial de agentes terapêuticos, sendo que os mesmos são produzidos naturalmente. Alguns podem ser quimicamente modificados após sua produção natural, sendo estes os antibióticos semi-sintéticos.

Paralelamente a estes, existem os quimioterápicos que constituem uma classe de antimicrobianos obtidos sinteticamente (ATLAS, 1996).

A atuação de antibióticos β -lactâmicos, como ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, ocorre de maneira irreversível às proteínas fixadoras de penicilina ou PBPs, inibindo sua ação. Estas proteínas estão localizadas na face externa da membrana citoplasmática participando de maneira fundamental da 3ª etapa da biossíntese das novas moléculas de peptoglicanos e sua incorporação no peptoglicano preexistente na parede celular da bactéria em multiplicação. Dessa maneira, ocorre a divisão celular da célula bacteriana, formação de septos entre as bactérias filhas e seu alongamento. Os β -lactâmicos também possuem atividade por aumentarem a atividade das autolisinas, substâncias que lisam a parede celular formando septos para que novos componentes do peptoglicano possam ser incorporados à parede celular em crescimento (JACOBY & ARCHER, 1991, TAVARES, 1999).

A estreptomicina e outros aminoglicosídeos agem sobre a membrana citoplasmática provocando alterações devido a formação irregular de seus constituintes. Eles agem em nível de ribossomo onde interferem na síntese das proteínas produzindo seu bloqueio ou causando a formação de proteínas erradas, dependendo da fração do ribossomo à qual se ligam (SOARES, 2001). Em concentrações terapêuticas eles ligam-se à fração 30S provocando uma distorção no RNA-mensageiro ligado a esta fração do ribossomo. Desta forma a união dos aminoácidos se faz de maneira diferente da codificada geneticamente, originando proteínas aberrantes. Estas proteínas aberrantes ao serem incorporadas à membrana celular, enzimas e outras estruturas essenciais, provocam alterações em sua função. Trata-se, portanto, de um efeito secundário a uma alteração primária em outro local (JACOBY & ARCHER, 1991, ATLAS, 1996, TAVARES, 1999).

A primeira referência à resistência antibiótica surgiu nos anos 40 com as penicilinas, tendo ressurgido com o advento dos novos antibióticos, nos anos 50 e 60, com a resistência dos gonococos às penicilinas e às tetraciclina. Hoje em dia esta resistência causa enormes problemas na terapêutica com implicações na saúde pública (SOARES, 2001).

No mundo atual, a pesquisa, a descoberta e a produção de novos agentes antimicrobianos revelam-se crescentes e necessários, devido a seu emprego em medicina humana e veterinária. De grande importância são os antibióticos e hormônios, aí utilizados como fator de engorda de animais e rápido crescimento para a alimentação humana, onde os antibióticos são utilizados como estimulantes de crescimento em rações, como a tetraciclina e penicilina, e cujos resíduos podem ser eliminados no leite ou nos ovos, ou ainda estar presentes nos produtos cárneos. Também são utilizados na proteção contra a deterioração de alimentos mantidos no gelo, em conservas, no combate a ervas daninhas e na preservação de plantas e em meios seletivos usados em laboratórios (GERMANO & GERMANO, 2003, PELCZAR Jr et al., 1996, TAVARES, 1999).

Os resíduos de antimicrobianos em alimentos, consequência direta do seu uso em Medicina Veterinária, devem ser observados quanto a questão de resistência bacteriana. O avanço tecnológico implica em uma dependência cada vez maior do uso de substâncias químicas, como medicamentos de uso veterinários ou aditivos, na criação de animais de interesse econômico. Atualmente existem cerca de 121 medicamentos usados em Medicina Veterinária que contém antimicrobianos em suas formulações, como: gentamicina, neomicina e penicilina. Portanto, o uso de antimicrobianos em pecuária deve ser discutido quanto ao aparecimento de formas de microrganismos resistentes (PALERMO NETO, 2001).

Apesar do controle de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal, ainda são encontrados microrganismos resistentes a estes agentes provavelmente devido à administração errada realizada nas propriedades de exploração zootécnica por pessoas sem qualquer tipo de orientação sobre a administração correta destes (BRASIL, 1999).

A exposição de microrganismos a doses subletais de antimicrobianos resulta no desenvolvimento de cepas que têm a resistência aumentada para estes antimicrobianos. Por esta razão, tornou-se necessária às investigações sobre o comportamento das bactérias frente aos antimicrobianos (COSTA et al., 2002).

A prescrição de antimicrobianos é feita para combater determinados agentes bacterianos envolvidos no processo infeccioso e não um único agente. A indicação de drogas específicas para o tratamento de doença seria muito boa se todas as bactérias apresentassem sensibilidade constante às drogas. No entanto, a maioria dos agentes apresenta variação de sensibilidade *in vitro* destes microrganismos (COSTA et al., 2002).

O perfil de resistência que cepas de microrganismos vem apresentando deve-se ao uso indiscriminado de drogas que, exercendo a chamada “pressão seletiva”, vem contribuindo para o aumento de fatores de resistência pelas bactérias o qual é transferível através dos mecanismos de recombinação genética (TRABULSI, 1999). Este uso indiscriminado de drogas chama a atenção pelo temor de que o aumento do uso de antibióticos na pecuária contribua para o desenvolvimento de bactérias cada vez mais resistentes.

A resistência aos antimicrobianos, sendo um fenômeno genético, pode ser natural ou adquirida, relacionado à existência de genes contidos em unidades cromossomais e extra-cromossomais do microrganismo, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (TAVARES, 1999).

A resistência natural ou intrínseca faz parte das características biológicas primitivas dos microrganismos e é observada em determinada espécie bacteriana. Resulta de genes cromossômicos que codificam a existência na célula de estruturas ou mecanismos que impedem o antibiótico de agir em seu receptor, ou que codificam a falta de sítio de ação da droga, ou que determinam a existência de receptores inadequados para a ligação com uma substância específica (SOARES, 2001, TAVARES, 1999).

A resistência adquirida é aquela que surge em uma bactéria primitivamente sensível a este mesmo antimicrobiano, aparecendo, posteriormente, em exemplares que não sofrem a ação da droga. Esta resistência pode ser adquirida através de DNA extra-cromossômico, os plasmídeos, que conferem à célula características biológicas adicionais, como a expressão de resistência aos antimicrobianos (ATLAS, 1996, TAVARES, 1999).

A resistência pode ser ainda originada por mutações durante o processo reprodutivo havendo erros de cópia para formação do DNA (TAVARES, 1999).

O mecanismo de troca de material genético (transdução, conjugação e transposição) também possibilita a transferência de genes de resistência entre as espécies bacterianas e mesmo entre gêneros bacterianos (ARCHER & CLIMO, 1994, SOARES, 2001).

Os antibióticos não parecem ser agentes mutagênicos, portanto, não são causa direta do surgimento de resistência, eles apenas selecionam os microrganismos resistentes que existem em uma população bacteriana. Entretanto, os antibióticos podem ter a capacidade de induzir resistência em determinadas espécies bacterianas (TAVARES, 1999).

A resistência aos antibióticos pode ser simples, quando há resistência a apenas uma droga, ou múltipla, quando há resistência simultaneamente a duas ou mais drogas, e a resistência cruzada quando o mecanismo bioquímico de resistência a uma droga é o mesmo para outras (JACOBY & ARCHER, 1991, TAVARES, 1999).

A resistência cruzada geralmente age dentro de uma mesma família de antibióticos, mas isto não é rigorosamente observado, pois a resistência cruzada depende do mecanismo de resistência, o que ocorre com os aminoglicosídeos onde a resistência pode ser pela produção de fosforilases, acetilases e adenilases, alterações do ribossomo que impedem sua ação e por bloqueio da permeabilidade às drogas. Como exemplo podemos observar o desenvolvimento da resistência à estreptomicina por bloqueio da permeabilidade, o mesmo apresentado por outros aminoglicosídeos, pois estes não penetram imediatamente na célula, necessitando de um sistema ativo de transporte. Modificação neste sistema de transporte seria a causa de resistência a estas drogas. No entanto, quando a resistência for devida à alteração ribossomal ela é específica a este antibiótico, não acarretando resistência cruzada aos demais membros do grupo (JACOBY & ARCHER, 1991, TAVARES, 1999).

As resistências, provavelmente, estão relacionadas ao uso abusivo de antibióticos, que favorece a seleção de linhagens com diferentes mecanismos de resistências, bem como a transferência dos genes responsáveis por estas

características, através dos plasmídeos de resistência. Dentro de um mesmo ambiente sob grande pressão seletiva pelo uso de antimicrobiano, é possível observar a transferência de resistência frente a antimicrobianos através de plasmídeos, sendo este um problema principalmente nos hospitais, que pode ocorrer entre diferentes espécies bacterianas (BOU et al., 2002, SHEN et al., 1999, WINOKUR et al., 2001).

A resistência a antimicrobianos tem resultado em aumento de mortalidade e morbidade, como também em alto custo para o tratamento de infecções provocadas por bactérias multirresistentes (ARCHER & CLIMO, 1994).

É importante ressaltar que as drogas também são utilizadas na terapêutica humana, sugerindo que em casos de toxinfecções alimentares causadas por um destes microrganismos talvez não sejam eficientes para o tratamento (COSTA et al., 2002).

O perfil de resistência pela espécie bacteriana, em questão a *E. coli*, é variável entre os países, regiões e origem de cepas, de acordo com vários estudos realizados (PAGANI et al., 2003; GIAMMANCO et al., 2002; KHAN et al., 2002; ADWAN et al., 2004; SCHROEDER et al., 2003; DONTOROU et al., 2003; MORA et al., 2005; RADU et al., 1998).

Neste contexto, os alimentos de origem animal tornam-se potenciais transmissores de infecções de difícil tratamento uma vez que os antibióticos são usados nas criações de aves, bovinos e suínos, sendo ministrados também como medida preventiva, onde tal prática favorece a presença de resíduos de antibióticos nestes alimentos e conseqüentemente a seleção de bactérias resistentes (PALERMO, 2001).

3. OBJETIVOS

Sendo a carne moída um produto de grande consumo nacional é importante demonstrar possíveis falhas que estejam ocorrendo durante a sua comercialização. O objetivo deste trabalho foi verificar o comportamento de cepas de *E. coli* isoladas de carne moída, moedor de carne e das mãos dos manipuladores, determinando:

- a ocorrência de STEC através da pesquisa dos genes *stx* 1 e *stx* 2,
- pesquisa do gene *eae*,
- comprovação se as cepas positivas para *stx* pertencem ao sorogrupo O₁₅₇,
- caracterização de resistência antimicrobiana entre as *E. coli* isoladas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foi avaliada a presença de *E. coli* isolada de carne moída, mãos dos manipuladores e do moedor de carne em estabelecimentos comerciais (9 açougues, 6 mercearias e 8 supermercados) do município de Taquaritinga – S. P. durante o período de março de 2004 a janeiro de 2005.

4.1. Coleta, Transporte e Semeadura das Amostras

4.1.1. Carne

Foram coletadas 23 amostras de carne moída sendo realizada de forma como se fosse oferecer à venda ao consumidor. Nos estabelecimentos era encontrada carne já moída estando em exposição em vitrine ou a sua moagem no momento da venda a pedido. As amostras de carne foram colocadas em sacos plásticos como de costume de

cada estabelecimento no seu acondicionamento, contendo cada amostra, em média, 200g no total.

Eram identificadas (recebendo uma seqüência numérica a título de identificação no laboratório) e colocadas em caixa térmica sob temperatura controlada (a caixa térmica continha gelo reciclável e termômetro para controle da temperatura), mantendo a temperatura de refrigeração (2-8°C) até sua análise no laboratório.

No laboratório, era feita a homogeneização da carne dentro do próprio saco plástico onde estava acondicionada para posterior retirada da alíquota para a análise.

4.1.2. Mãos dos Manipuladores

Para a coleta das amostras das mãos dos manipuladores foi utilizado swab umidecido em água peptonada esterilizada. Foi utilizado um tubo contendo 10 ml de água peptonada (diluição 10^{-1}) para transporte e iniciar as diluições.

O swab era passado por toda a superfície das mãos, dedos e sob a unha dos açougueiros antes de proceder a manipulação da carne. Depois colocado no tubo contendo a água peptonada e transportado ao laboratório em caixa térmica, com temperatura controlada, conforme realizado com as amostras de carne.

De cada estabelecimento era realizada a coleta de um manipulador.

4.1.3. Superfície de Equipamentos

Para a coleta das amostras dos moedores de carne, procedia-se da mesma maneira que as amostras das mãos onde era utilizado swab umidecido em água peptonada esterilizada, sendo utilizado um tubo contendo 10 ml de água peptonada (diluição 10^{-1}) para o transporte e sucessivas diluições.

O swab era passado por toda a superfície da entrada da carne no maquinário e na saída da mesma, antes da carne ser moída. Este swab era então acondicionado em tubo contendo a água peptonada e transportado ao laboratório, em caixa térmica, tendo sua temperatura controlada, conforme realizado com as amostras de carne.

De cada estabelecimento era realizada a coleta de um moedor.

4.2. Análise Microbiológica

No laboratório eram pesados 25 g de carne moída e esta colocada em saco plástico com 225 ml de água peptonada esterilizada. Então, realizava-se a homogeneização. Esta primeira diluição foi considerada a diluição 10^{-1} (APHA, 1992, BRASIL, 2003).

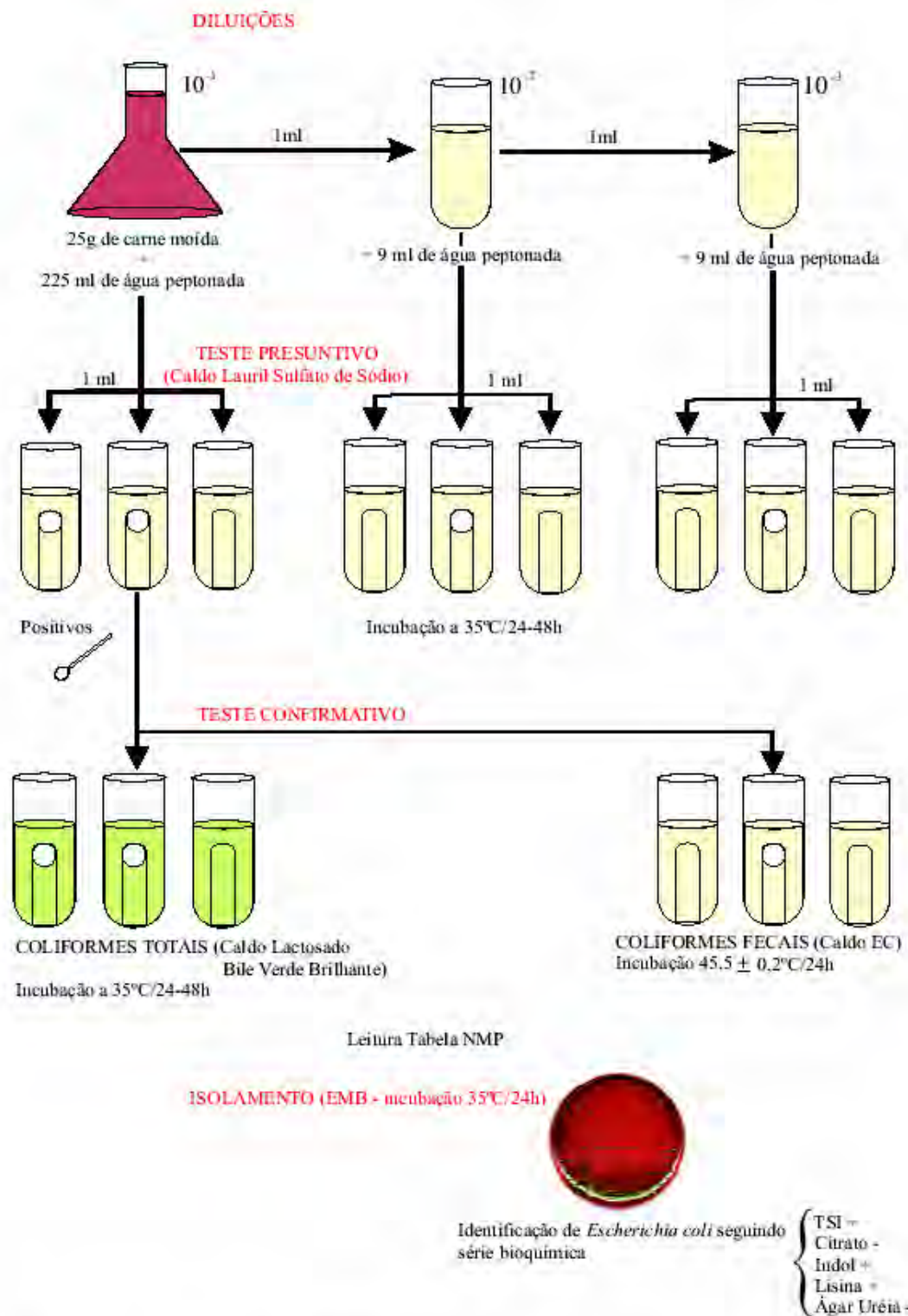
Em seguida eram efetuadas as demais diluições em série até a diluição 10^{-3} . Iniciando-se a partir destas diluições o Teste Presuntivo e Teste Confirmativo para Coliformes Totais e Fecais, conforme Fluxograma 1.

O mesmo procedimento, incluindo diluições e testes, foi realizado com os tubos contendo os swabs das mãos dos manipuladores e dos moedores de carne, conforme o Fluxograma 2.

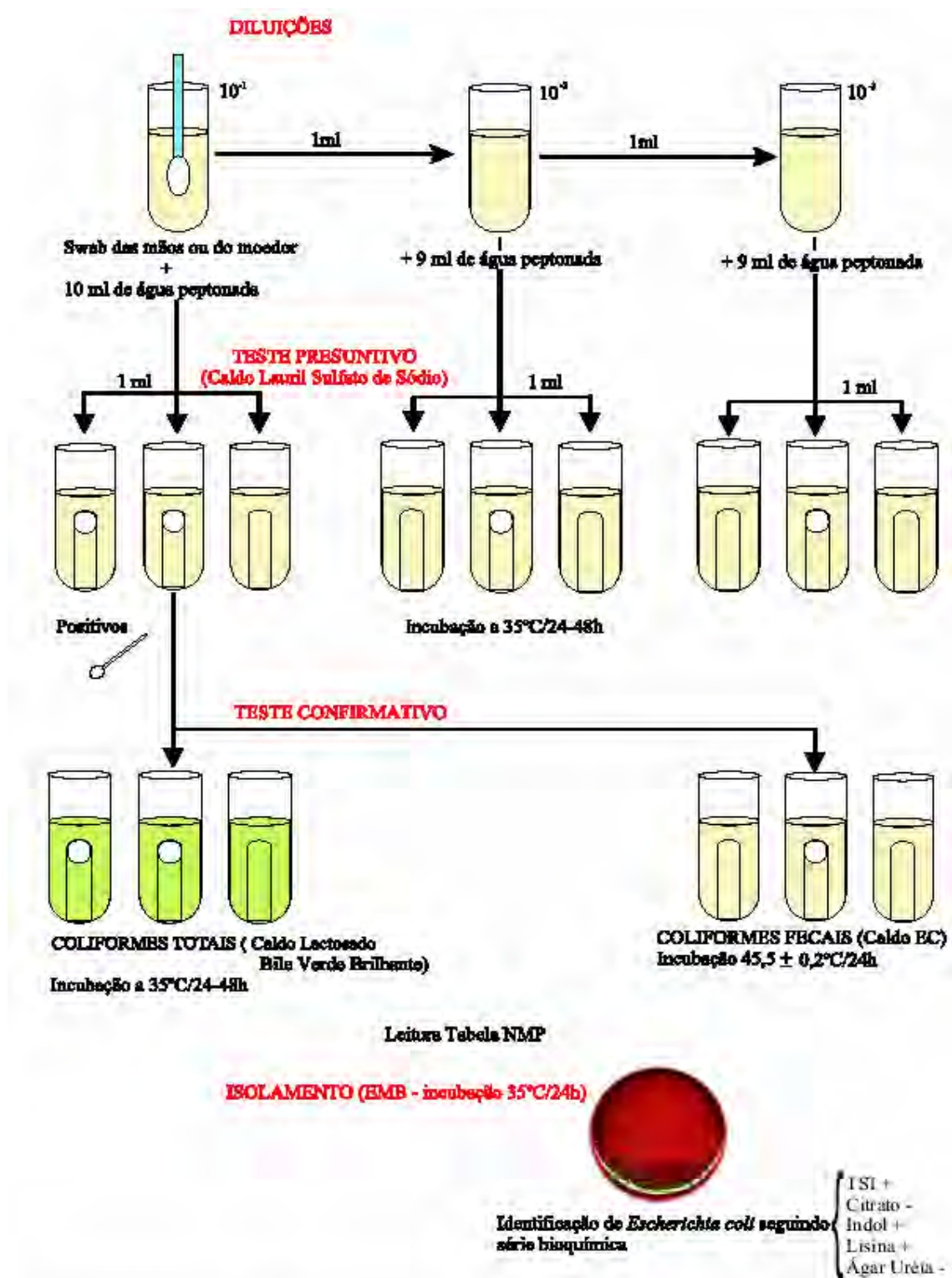
4.2.1. Teste Presuntivo

Da diluição inicial era retirado 1 ml e colocados em tubos contendo 9 ml de Caldo Lauril Sulfato de Sódio (CLSS) (diluição 10^{-1}). Procedia-se da mesma maneira até completar a diluição 10^{-3} . Os tubos continham tubos de Duhran para retenção de gás produzido e leitura da prova. Os tubos eram agitados e levados em banho Maria a 35°C por 24-48h (APHA, 1992, BRASIL, 2003).

Após 24/48h era efetuada a leitura. Os tubos que apresentassem a produção de gás e turvação eram submetidos ao Teste Confirmativo.



FLUXOGRAMA 1 - Diluição e isolamento de *Escherichia coli* da carne moída.



FLUXOGRAMA 2 - Diluição e isolamento de *Escherichia coli* das mãos dos manipuladores e do moedor de carne.

4.2.2. Teste Confirmativo

Dos tubos de Caldo Lauril Sulfato de Sódio que apresentassem turvação e presença de gás, com o auxílio de uma alça de platina, eram retiradas alçadas e inoculadas em tubos contendo Caldo Bile Verde Brilhante (CBVB) e Caldo *Escherichia coli* (CEC) para a análise da presença de coliformes totais e fecais, respectivamente.

Os tubos continham tubos de Duhran para analisar a produção ou não de gás.

Os tubos eram agitados e levados para banho Maria, sendo que, os que continham Caldo Bile Verde Brilhante foram mantidos a 35°C/24-48h e os que continham Caldo EC foram acondicionados na temperatura de $45,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24h.

Para a leitura foram considerados positivos os tubos que apresentaram a produção de gás e turvação. Estes foram lidos conforme a Tabela de Número Mais Provável de Hoskins (NMP) (QUADRO 1 do APÊNDICE). Destes tubos (tanto os positivos para coliforme totais como fecais) era realizado o isolamento bacteriano, quando passados para placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB).

4.2.3. Isolamento de *E. coli*

Com o auxílio de uma alça de platina, era retirada uma alíquota dos tubos que apresentassem a retenção de gás nos tubos de Duhran e turvação. Esta era semeada por esgotamento na superfície das placas contendo o meio de cultura Eosina Azul de Metileno.

Este procedimento foi realizado tanto para os tubos positivos contendo o Caldo Bile Verde Brilhante como para os tubos contendo o Caldo EC, para verificar o provável crescimento de *E. coli*.

As placas eram levadas invertidas à estufa a 37°C por 24h. Após este período realizava-se a leitura. Eram consideradas prováveis *E. coli* as colônias que apresentassem o centro negro e contra a luz a coloração azul/esverdeada metálico.

Estas colônias eram passadas para tubos contendo ágar Luria Bertani (LB), levadas para estufa a 37°C/24h. Após este período, estocadas e aguardando a série bioquímica.

4.2.4. Provas Bioquímicas

As provas bioquímicas para confirmação bacteriana de *Escherichia coli* foram realizadas com culturas jovens, que estavam em ágar LB, incubadas a 37°C/24h. Foram utilizados:

- Ágar Ferro Tríplice Açúcar (TSI) em superfície e profundidade. Os tubos eram incubados a 37°C/24h. Era considerada positiva quando tal meio tornava-se amarelo;
- Ágar Citrato de Simons onde as amostras eram semeadas em superfície e incubadas a 37°C/24h. A *E. coli* não possui crescimento neste meio, portanto, não há alteração da cor do mesmo (verde);
- Prova de Indol onde as amostras primeiramente eram crescidas em água peptonada (1%) a 37°C/24h. Após o crescimento bacteriano foram adicionadas, em média, de 4 a 6 gotas de Reativo de Kovacs. Eram consideradas positivas a esta prova os tubos onde se formava na superfície um halo vermelho;
- Prova da Lisina foi realizada em tubos onde as amostras eram inoculadas, cobertas com óleo mineral e levadas em incubação a 37°C por 24 horas. Caso a cor permanecesse roxa tal prova era positiva, havendo a mudança de coloração para amarelo era negativa. Deve-se tomar cuidado nessa prova, pois pode haver reação tardia recomendando-se incubar por mais 24 horas em caso de dúvida na alteração da cor;
- A prova da Uréia foi realizada utilizando o ágar uréia, onde as cepas eram semeadas em superfície. Não há alteração da coloração do meio quando se tratar de *Escherichia coli*. Nesta prova deve-se tomar muita atenção, pois a mudança de cor para rosa (negativo) pode ser muito discreta.

Tendo assim passado por todas as provas bioquímicas as cepas eram semeadas em meio de cultura em agitação por 24 horas e, após o crescimento, eram transferidas

1000 µl da cultura em eppendorf contendo 250 µl de glicerol 100%. Eram agitados para completa mistura da cultura com o glicerol, identificados e estocados em freezer a –18°C.

4.3. Extração de DNA Template

A extração do DNA foi realizada segundo a técnica descrita por KESKIMAKI et al. (2001) onde as cepas de *E. coli* eram crescidas, em tubos contendo 2 ml de caldo BHI overnight. Após o crescimento, 1 ml desta cultura era transferida para um eppendorf e precipitada a 12000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante era descartado e o pellet, formado por células bacterianas, era ressuspensionado em 500 µl de água de Milli Q autoclavada. Agitava-se bem em vortex para completa diluição e era levado novamente à centrífuga a 12000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante era novamente descartado e o pellet de células ressuspensionado em 500 µl de água Milli Q autoclavada. Novamente era centrifugado a 12000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante era desprezado e o pellet ressuspensionado em 250 µl de água Milli Q autoclavada.

Os eppendorfs contendo a suspensão de células bacterianas eram levados em água em ebulição a 100°C por 10 minutos para rompimento da célula bacteriana e liberação do material genético (DNA). Após retirados da fervura eram centrifugados a 12000 rpm por 30 segundos. Do sobrenadante era retirada uma alíquota de 150 µl do sobrenadante e transferido para um novo eppendorf onde era levado para conservação em freezer a –18°C.

O sobrenadante foi utilizado na reação de PCR para determinação dos genes de virulência (*stx 1*, *stx 2* e *eae*).

4.4. Determinação de Gene de Virulência (*stx 1*, *stx 2* e *eae*)

A determinação dos genes de virulência *stx 1*, *stx 2* e *eae* foram realizados conforme ORDEN et al. (1998) e CHINA et al. (1996), respectivamente, e a sequência de bases, localização e o tamanho dos primers específicos para a amplificação dos produtos específicos *stx 1* e *stx 2* são apresentados na Tabela 1 e do *eae* na Tabela 2.

Os primers utilizados foram adquiridos de IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.). A amplificação do DNA bacteriano foi realizado com 50µl contendo 10µl de amostra do sobrenadante, 150 µl de cada primer, 0,2 mM (cada) dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, e 2,5U de Amplitaq DNA polimerase. Esta mistura foi realizada com um termociclador (Eppendorf Mastercycler) a 94°C por 2 minutos para um ciclo (desnaturação) seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão). No último ciclo, a última fase foi realizada por um tempo maior (10 minutos) para completa extensão pela Amplitaq DNA polimerase.

TABELA 1 – Primers usados no PCR para amplificação dos fragmentos específicos de genes para *stx1* e *stx2*.

Primer	Seqüência de oligonucleotídeos (5'3')	Localização do gene	Tamanho do produto da amplificação (pb)
<i>stx 1a</i>	CAGTTAATGTGGTGGCGAAG	215-234	894
<i>stx 1b</i>	CTGCTAATAGTTCTGCGCATG	1089-1109	
<i>stx 2a</i>	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	288-307	478
<i>stx 2b</i>	GGATGCATCTCTGGTCATTG	747-766	

TABELA 2 – Pares de primers usados neste estudo para identificação do gene *eae*.

Gene	Primer e seqüência	Tamanho do produto do PCR (bp)
<i>Eae</i>	B52, AGGCTTCGTCACAGTTG B53, CCATCGTCACCAGAGGA	570

Os produtos da amplificação foram visualizados através de eletroforese de 10 µl da mistura da reação final da PCR em gel de agarose 1%. Os fragmentos da amplificação do DNA dos tamanhos específicos foram corados com brometo de etídio e verificados sob luz fluorescente ultra-violeta. Os marcadores moleculares foram incluídos em cada gel (φx174 *Hae* III digest).

4.5. O₁₅₇ Latex Aglutinação

As cepas confirmadas no PCR como produtoras de shiga-toxina (*stx*) foram sorotipadas para o antígeno O do sorogrupo O₁₅₇ usando o Kit teste O₁₅₇ Latex Aglutinação (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), onde uma alíquota da cepa era semeada sobre o cartão teste e sobre este, gotas do reagente. Para leitura observa-se a formação de grumos de aglutinação como sendo resultado positivo e não havendo a formação foi considerado resultado negativo para o sorogrupo O₁₅₇.

4.6. Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana

As cepas de *E. coli* isoladas eram submetidas ao Antibiógrama para a determinação do perfil de resistência bacteriano aos antimicrobianos. Foi utilizado o método de disco difusão conforme o NCCLS (2000).

O Ágar Müller Hinton (MHM), previamente esterilizado e resfriado a 50°C, era distribuído em placas de Petri esterilizadas (25X12 mm) na quantidade necessária (cerca de 40 ml) para formar uma camada de 5 mm de espessura.

Foram utilizadas drogas de uso corrente na terapêutica veterinária e humana como: Ácido Nalidíxico (30 µg), Amicacina (30 µg), Amoxicilina (10 µg), Ácido clavulânico + Amoxicilina (30 µg), Ampicilina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cotrimoxazol (25 µg), Estreptomicina (10 µg), Gentamicina (10 µg), Tetracilina (30 µg).

Os inóculos das cepas foram preparados a partir da cultura que era reativada em placas contendo ágar LB, crescidas a 37°C/24h, e preparando uma suspensão bacteriana com cerca de 5 colônias em tubos contendo caldo LB e levados em estufa a 37°C por cerca de 2 a 4 horas até obter o padrão 0,5 na escala de Mc Farland.

Após o crescimento, eram homogeneizados e, com auxílio de swab o inóculo era semeado em toda a superfície do MHM. Esperava-se a secagem da superfície e então os discos eram adicionados de forma eqüidistante e pressionados levemente sobre a superfície do meio de cultura, com auxílio de pinça. Em seguida, as placas invertidas eram levadas em estufas e incubadas a 37°C/18 a 24 horas.

As placas foram examinadas quanto à presença ou ausência de halo de inibição, ao redor dos discos, e a determinação do diâmetro do halo de inibição foi efetuada com auxílio de régua milimétrica. Os resultados foram interpretados como resistentes (R), intermediários (I) ou sensíveis (S), segundo NCCLS (2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas amostras de *E. coli* isoladas de diferentes locais (carne moída, moedor de carne e mãos dos manipuladores) do comércio varejista de carne, para pesquisa de resistência antimicrobiana e genes de virulência, no município de Taquaritinga – S.P.

Durante o trabalho foram pesquisados 23 estabelecimentos comerciais de onde foram coletadas amostras de carne moída, swab das mãos dos manipuladores e dos moedores de carne.

Nos testes confirmativos para coliformes totais e fecais da carne moída foi possível constatar que o Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais foi >1100 em 9 (39,13%) amostras, sendo também encontrado igual valor para Coliforme Fecais em 4 (17,39%) amostras. Em todos os estabelecimentos houve a presença de Coliformes Totais e em 12 (52,17%) estabelecimentos a presença de Coliformes Fecais foi maior que 3,0 (FIGURA 1).

Pela legislação (BRASIL, 2001) não é permitido apenas a presença de *Salmonella* sp em 25g de amostra de carne moída analisada. Para as demais classes microbianas não há referência quanto a quantidade permitida.

A presença de bactérias do grupo coliformes totais indica que as amostras sofreram contaminação de origem ambiental, bem como a constatação de coliformes fecais na carne moída aponta para possíveis falhas que possam ter ocorrido desde o abate, manipulação e armazenamento da mesma mostrando as características higiênico-sanitárias inadequadas pela qual possa ter passado até o final de sua cadeia no comércio varejista do referido produto.

REINDERS et al. (2001) demonstraram que a aplicação de Boas Práticas de Manipulação diminui a contaminação de carcaças bovinas pelas fezes durante o abate. Assim também HEUVELINK et al. (2001) verificaram que a aplicação de programas no controle de qualidade durante o abate leva a diminuição da contaminação das carcaças sendo um importante passo para diminuir a incidência de doenças veiculadas por alimentos.

O índice elevado de coliformes totais das carnes pode estar relacionada à contaminação durante o manuseio, a limpeza de superfície de contato e/ou utilização inadequada dos saneantes, desde o abate ao varejo, além da contaminação por manipuladores.

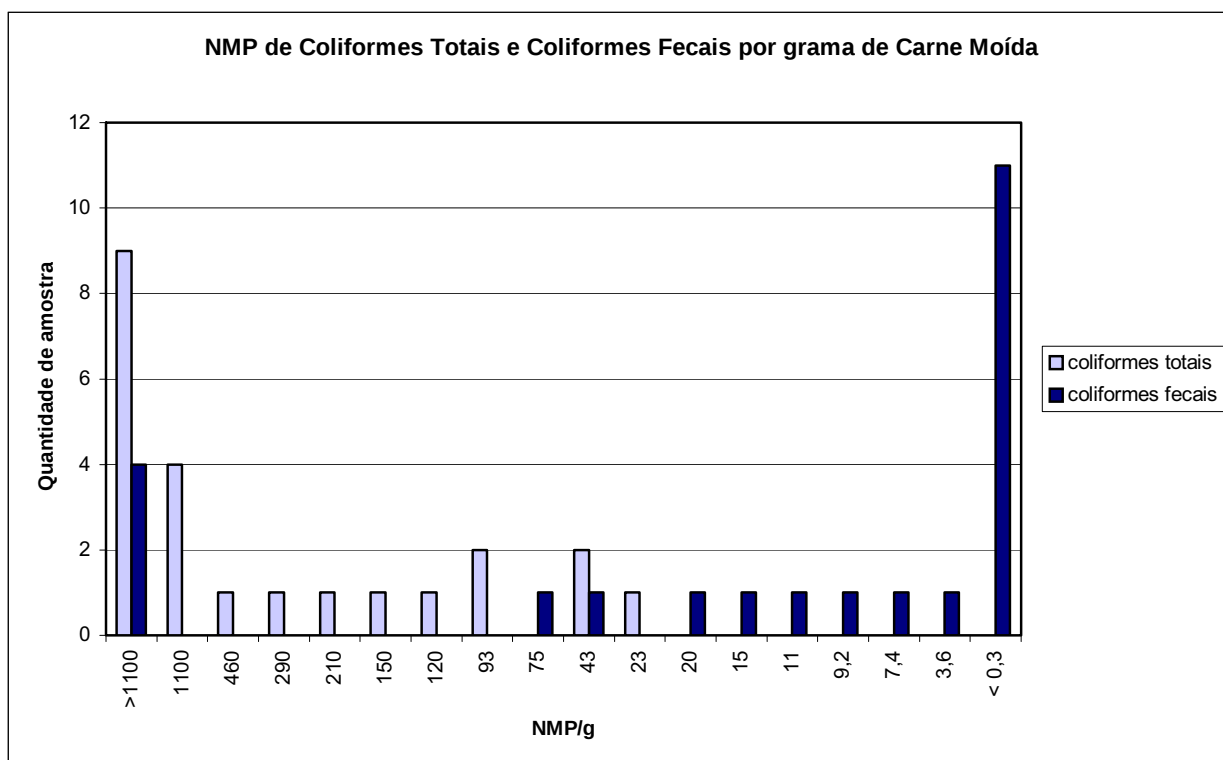


FIGURA 1 - Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais por grama de Carne Moída de um total de 23 estabelecimentos comerciais no município de Taquaritinga – S.P., no período de março de 2004 a janeiro de 2005 (valores correspondentes no QUADRO 2 do APÊNDICE).

A análise microbiológica de alimentos é uma ferramenta útil para elucidar dúvidas relacionadas a possíveis veículos de contaminação e o agente etiológico que possa se encontrado.

No que se refere à carne, no momento da coleta das amostras foi possível constatar em alguns estabelecimentos que a mesma já estava moída (14 estabelecimentos – 60,87%) e mantida em vitrines, sendo que pela legislação (SÃO PAULO, 1978) tal fato é proibido e a carne deve ser moída somente a pedido do consumidor para evitar qualquer risco de proliferação bacteriana devido ao aumento da superfície de contato da carne com o ambiente.

OLIVEIRA et al. (1999) constatou a presença de coliformes fecais em hambúrguer de frango, o que demonstra um produto que passa por várias fases de manipulação podendo ocorrer a falha em algum ponto da cadeia produtiva.

A ocorrência de coliforme fecal é indicadora de contaminação por fezes de animais de sangue quente e humanos, e da possibilidade da presença de bactérias patogênicas, que tem seu habitat no trato intestinal. Segundo a RDC 12 de 2001 (BRASIL, 2001), a denominação “coliformes a 45°C” é equivalente a coliformes fecais e coliformes termotolerantes, sendo capazes de fermentar a lactose a 44-45°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$) em 24h, compreendendo o gênero *Escherichia*.

Das mãos dos manipuladores foi constatado o NMP de Coliformes Totais >1100 em 5 (21,74%) amostras e em 1 (4,34%) amostra para Coliformes Fecais. Sendo que foram encontradas contagens de Coliformes Fecais das mãos dos manipuladores em 10 (43,48%) estabelecimentos (FIGURA 2).

A presença de coliformes fecais nas mãos dos manipuladores é uma indicação de higienização incorreta representando um papel importante na cadeia epidemiológica das toxinfecções alimentares, pois este pode estar transferindo o agente para diversos alimentos e contaminando maquinários. Neste trabalho foi constatada a presença de *E. coli* isoladas das mãos de 3 manipuladores (13,04%) nos 23 estabelecimentos comerciais. MAINIL et al. (1999) ao analisarem amostras de *E. coli* puderam notar que as provenientes de bovinos, suínos e humanos poderiam pertencer ao mesmo sorotipo carreando genes de virulência.

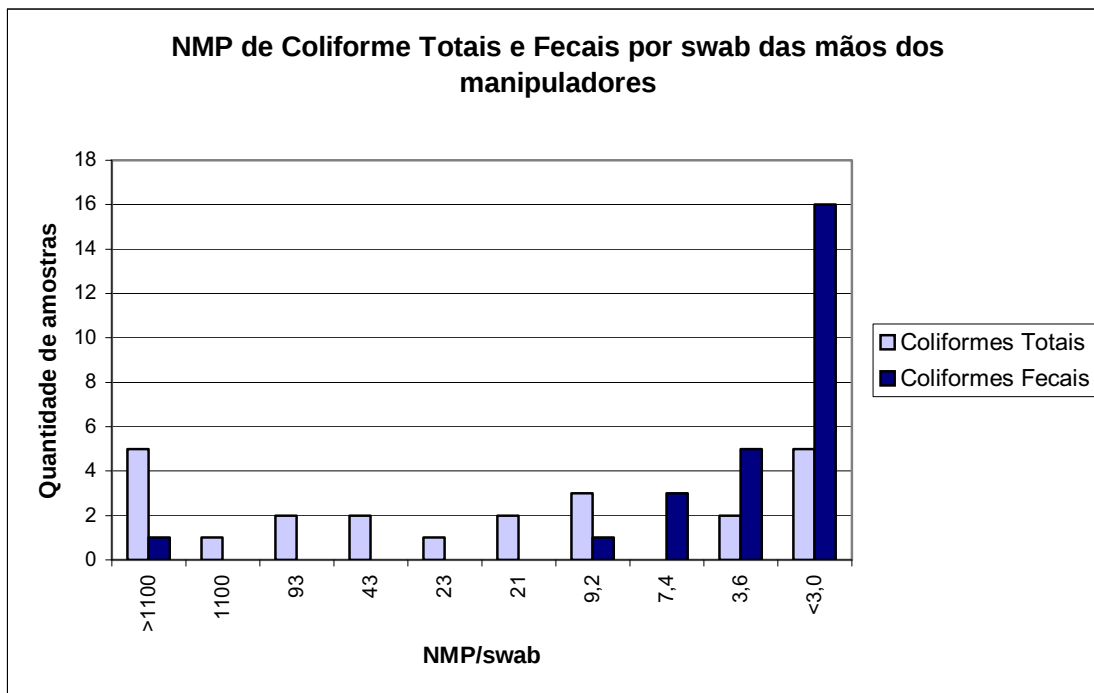


FIGURA 2 - Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais por swab das mãos dos manipuladores de um total de 23 estabelecimentos comerciais no município de Taquaritinga - S.P., no período de março de 2004 a janeiro de 2005 (valores correspondentes no QUADRO 3 do APÊNDICE).

Dos moedores de carne foi constatado NMP de Coliformes Totais > 1100 em 8 (34,78%) amostras e em 1 para o mesmo NMP de Coliformes Fecais (Figura 3).

Nos moedores de carne foram encontrados Coliformes Totais em 21 (91,30%) estabelecimentos e Coliformes Fecais em 12 (52,17%) estabelecimentos, sendo estes números elevados o que é uma preocupante demonstrando falhas na higienização do moedor de carne. Deste modo ele seria uma via de transmissão no comércio varejista, pois toda carne que por ele passar poderá estar sendo contaminada. Como a coleta de amostra de moedor foi realizada passando o swab antes de moer a carne, aponta-se para o fato de higiene incorreta havendo a possibilidade de formação de um biofilme no local, com retenção de matéria orgânica devido peculiaridades pela dificuldade de limpeza e higienização do maquinário.

Aparentemente alguns maquinários estavam limpos, mas pelos resultados apontados podemos verificar que a desinfecção dos mesmos não era realizada de maneira correta ou suficiente para eliminar os microrganismos patogênicos. ASLAM et al. (2004) observaram que em abatedouro o isolamento de *E. coli* dos equipamentos e instalações é grande favorecendo a transmissão para a carne, chamando atenção para o fato da contaminação cruzada.

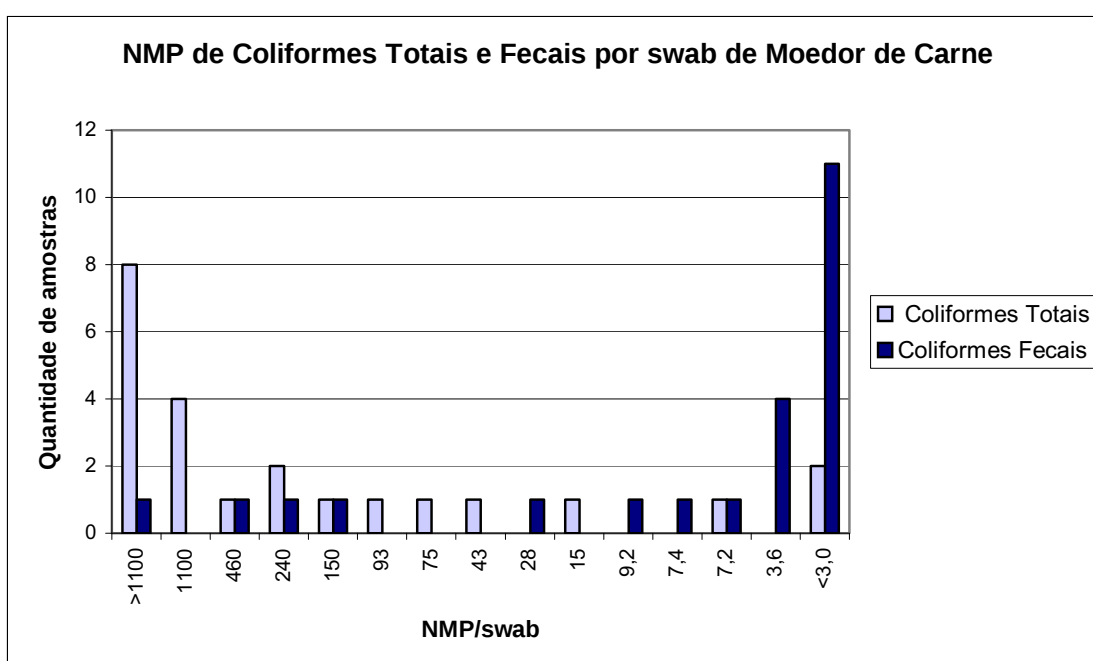


FIGURA 3 – Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais por swab do moedor de carne de um total de 23 estabelecimentos comerciais no município de Taquaritinga – S.P., no período de março de 2004 a janeiro de 2005 (valores correspondentes no QUADRO 4 do APÊNDICE).

De todos os estabelecimentos onde foram realizadas as coletas 14 (60,87%) continham *E. coli*. A contaminação com *E. coli* variou conforme o local da coleta, no total foram isoladas 287 cepas, sendo 91 (31,71%) isoladas de carne moída, 42 (14,63%) das mãos dos manipuladores e 154 (53,66%) dos moedores de carne,

sinalizando para o fato do produto funcionar como veículo de transferência desses patógenos para o consumidor. BLANCO et al. (2004) demonstraram que os bovinos são importantes reservatórios de *E. coli* para humanos ao analisarem a cadeia produtiva da carne e encontrarem a presença desta bactéria nas fezes bovina, carne moída e hambúrguer.

Esse microrganismo é comensal do trato gastrointestinal do homem e animais sendo amplamente disseminado. A grande maioria das cepas dessa bactéria não é patogênica, mas algumas como *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enterotoxigênica e *E. coli* enteroinvasiva, apresentam diferentes graus de patogenicidade, podendo causar graves doenças no homem (GERMANO & GERMANO, 2003). A carne pode ser contaminada por ocasião do abate ao entrar em contato com pêlos, pele, cascos, conteúdo do estômago e vísceras, equipamentos e utensílios, além das mãos e vestuário de funcionários e água contaminada.

A constatação de *E. coli* na carne moída aponta para possíveis falhas que possam ter ocorrido desde o abate, manipulação e armazenamento da mesma mostrando as características higiênico-sanitárias inadequadas pela qual possa ter passado até o final de sua cadeia no comércio varejista do referido produto, sendo esta um indicador sanitário. Devido sua patogenicidade poderá ser a causa de toxinfecções alimentares.

De todos os estabelecimentos onde foram realizadas as coletas das amostras de carne moída, foram isoladas *Escherichia coli* de 11 estabelecimentos (47,83%) sinalizando para o fato da carne moída funcionar como veículo de transferência desses patógenos para o consumidor. Destes 11 (47,83%) estabelecimentos foi possível observar que apenas em 4 (17,39%) foi isolado o patógeno somente da carne, pois em 5 (21,74%) deles houve o isolamento do moedor de carne e em 2 (8,70%) deles o isolamento ocorreu nos 3 pontos de coleta (carne moída, mãos do manipulador e do moedor de carne) (TABELA 3), demonstrando que a carne é um importante reservatório de *E. coli*.

TABELA 3 – Quantidade de estabelecimentos comerciais onde houve isolamento de *E. coli* no município de Taquaritinga – SP, no período de março de 2004 e janeiro de 2005.

Ponto de coleta no estabelecimento	Quantidade de estabelecimentos	Porcentagem (%)
Carne moída	4	17,39
Mãos dos manipuladores	1	4,34
Moedor de carne	2	8,70
Carne + moedor de carne	5	21,74
Carne + mãos dos manipuladores + moedor de carne	2	8,70
Nenhum isolamento	9	39,13
Total	23	100

Essa frequência de isolamento torna-se preocupante pelo fato do consumidor usar este produto em sua alimentação e na constituição de outros produtos como quibe, onde esta carne é utilizada sem nenhuma preparação que assegure a eliminação do agente da carne. NASCIMENTO et al. (2002) estudando amostras de quibe cru observaram o isolamento de *E. coli* em 11,1% das amostras.

O índice de 14,63% de *E. coli* das mãos dos manipuladores é um importante indicador para avaliar a situação grave de higiene, pois o simples fato de haver a presença de coliforme fecal (43,48%) já é uma preocupação, pois este sendo patogênico pode ser transmitido à carne.

A presença de *E. coli* nas mãos dos manipuladores é uma indicação de higienização incorreta representando um papel importante na cadeia epidemiológica das toxinfecções alimentares, pois este pode estar transferindo o agente para diversos alimentos e contaminando maquinários. Sua presença foi encontrada em 3 (13,04%) estabelecimentos comerciais, onde em 1 houve sua constatação somente nas mãos do

manipulador e nos outros 2 estabelecimentos foi constatada nos 3 pontos de coleta (TABELA 3).

MAINIL et al. (1999) ao analisarem amostras de *E. coli* puderam notar que as provenientes de bovinos, suínos e humanos poderiam pertencer ao mesmo sorotipo carreando genes de virulência, mostrando assim o homem como um importante elo na cadeia epidemiológica onde poderia estar contaminando o alimento, sendo uma fonte de contaminação ou mesmo servindo como veículo para o mesmo e levando ao desenvolvimento de enfermidades como colites hemorrágicas ou síndrome urêmica hemolítica, sendo causa de falência renal em humanos (BRETT et al., 2003, KHAN et al., 2002, RUIZ et al., 2002). JOHNSON et al. (2005) mostraram que há uma fração de *E. coli* extraintestinal envolvidas em contaminação alimentar e resistência antimicrobiana havendo a possibilidade deste agente ser de origem extraintestinal proveniente de humano e não somente devido à contaminação fecal da carne durante o abate.

Foram isoladas *E. coli* do moedor de 9 estabelecimentos, onde em 2 estabelecimentos houve o isolamento do agente somente do moedor, em 2 o isolamento dos 3 pontos de coleta e em 5 houve o isolamento também da carne (TABELA 3). Estes números são preocupantes, pois demonstram possíveis falhas que estão ocorrendo na higienização do equipamento. Deste modo ele seria uma fonte de infecção no comércio varejista, pois toda carne que por ele passar poderá estar sendo contaminada. ASLAM et al. (2004) observaram que em abatedouro o isolamento de *E. coli* dos equipamentos e instalações é grande e favorecem a transmissão à carne, chamando atenção para o fato da contaminação cruzada.

Neste trabalho podemos verificar que a carne moída e o moedor de carne participam como os principais disseminadores do patógeno neste tipo de comércio mantendo o agente no ambiente. Estes achados sugerem um produto processado em condições higiênico-sanitárias inadequadas, podendo esta contaminação ser atribuída às condições de higiene extremamente deficitárias dos locais de abate favorecendo contaminações cruzadas, assim como encontrado por RICHARDS et al. (1998).

Durante as diferentes etapas de processamento, desde o abate até o comércio varejista, a qualidade microbiológica da carne, a higiene de utensílios e equipamentos e dos manipuladores são pontos importantes para a segurança microbiológica do alimento que será entregue ao consumidor (ASLAM et al., 2004, REINDERS et al., 2001, LAGAGGIO et al., 2002).

O próprio animal é uma fonte de contaminação importante de microrganismos onde podem estar nas fezes, couro, casco contaminando a carne (McEVOY et al., 2003). Pelos resultados encontrados neste trabalho verificamos que, apesar da carne estar aparentemente sem alterações, o elevado número de microrganismos (287 cepas) indica que houve condições favoráveis para a multiplicação microbiana, provavelmente devido inadequação das condições do binômio tempo/temperatura. Também são indicações de contaminação por poeira, ambiente e manipulação desde o abate, etapa em que se inicia a contaminação por microrganismos, até sua manipulação final.

Conforme HEUVELINK et al. (2001), o controle da contaminação fecal da carcaça durante o abate como práticas higiênicas e exclusão de animais sujos na linha de produção, são importantes na diminuição da incidência de patógenos de origem alimentar associado a carne.

Constatou-se a ausência de contaminação por *E. coli* em qualquer ponto de coleta em 9 estabelecimentos (TABELA 3).

Na prova de atividade antimicrobiana o maior índice de resistência foi frente à tetraciclina. Os resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana (TABELA 4) mostraram um alto nível de resistência a tetraciclina, cefalotina, amoxicilina e estreptomicina. Em geral, estes achados estão em conformidade com dados de outros estudos os quais têm demonstrado que tal resistência é comum entre amostras isoladas de alimentos de origem animal e carne (SÁENZ et al., 2001; SCHROEDER et al., 2003). Resultado semelhante foi obtido por WHITE et al. (2000) ao estudarem *E. coli* proveniente de bovinos com diarreia onde suas amostras mostraram alta resistência (100%) frente a tetraciclina e estreptomicina podendo esta resistência serem transferidas via plasmídios em nível intestinal para a microbiota normal existente ou mesmo contaminando a carne durante o abate e assim até o consumidor. KHAN et al.

(2002) puderam observar multirresistência de *E. coli* isoladas de humanos, bovinos e carne.

TABELA 4 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana apresentado por 287 cepas de *E. coli* isoladas de carne moída, moedor de carne e mãos dos manipuladores de carne em 23 estabelecimentos comerciais no município de Taquaritinga – SP, no período de março de 2004 a janeiro de 2005.

Antimicrobianos	Cepas	
	S*(%)	R(%)
Tetraciclina	23,4	76,6
Amoxicilina	35,9	64,1
Cefalotina	41,2	58,8
Estreptomicina	48,8	51,2
Ácido nalidíxico	68,7	31,3
Ampicilina	76,4	23,6
Amicacina	83,4	16,3
Ciprofloxacina	84,7	15,3
Cotrimoxazol	87,8	12,2
Gentamicina	90,3	9,7
Ceftriaxona	92,7	7,3
Amoxicilina+ ácido clavulânico	96,6	3,4

Obs: O nível intermediário foi somado ao resistente.

*S - Sensível

R - Resistente

Esta resistência apresentada pode ser transferida através de plasmídeos a outros patógenos ou mesmo quando ingeridos transferi-los para a microbiota intestinal, sendo preocupante, pois estes mesmo poderiam estar envolvidos em enfermidades e já apresentar resistência antimicrobiana às drogas utilizadas.

A resistência antimicrobiana pode ser devida ao uso abusivo em animais não somente na terapêutica veterinária, mas também como uma maneira preventiva do desenvolvimento de enfermidades.

Foram encontrados também elevados índices de resistência, acima de 50%, para tetraciclina (76.6%), amoxicilina (64.1%), cefalotina (58.8%) e estreptomicina (51.2%).

A resistência para mais de 3 drogas foi encontrada em 67% dos isolados e 22% foram resistentes a mais de 6 antimicrobianos.

Dos 12 antimicrobianos analisados foram obtidos altos índices de ação em análise *in vitro* para *Escherichia coli*, a associação Ácido clavulânico + Amoxicilina (96,6%) seguida por ceftriaxona (92,7%), gentamicina (90,3%) conforme Tabela 4. Foi possível observar que das 287 cepas de *E. coli* analisadas para atividade antimicrobiana 30 (10,45%) foram sensíveis a todas as drogas utilizadas.

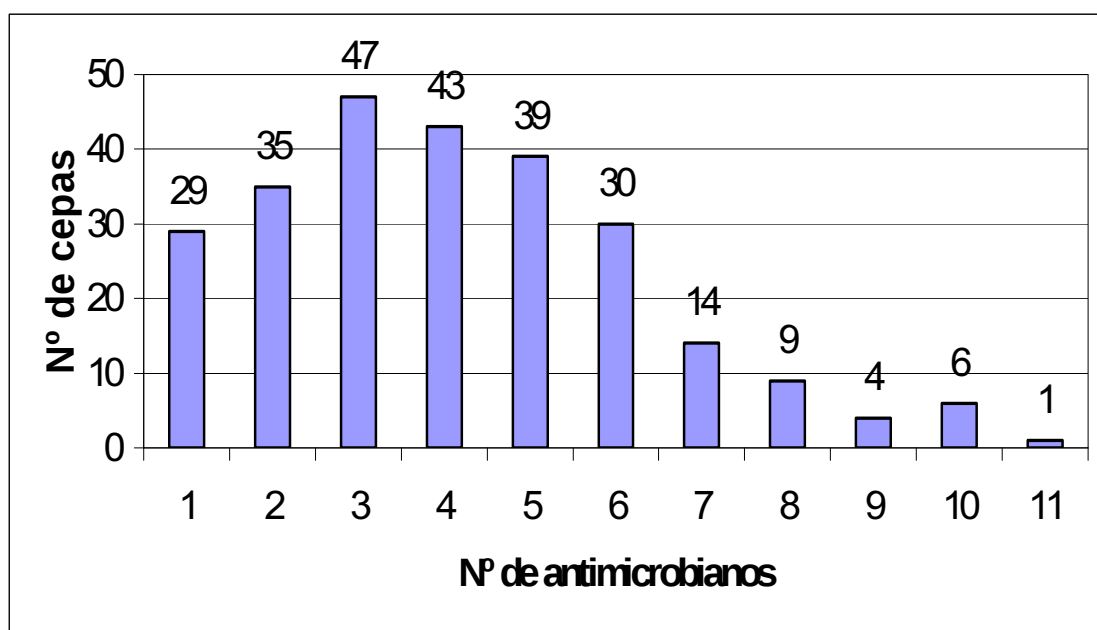


FIGURA 4 – Comportamento de cepas de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos testados, isoladas de estabelecimentos comerciais no município de Taquaritinga – S.P., no período de março de 2004 a janeiro de 2005.

DONTOROU et al. (2003) observaram grande sensibilidade das amostras as quais eram sensíveis aos 8 antimicrobianos testados.

A quantidade de cepas de *E. coli* isoladas (287), aliada ao caráter de resistência múltipla a antimicrobianos (FIGURA 4), passível de transferência e a possibilidade de linhagens patogênicas, sugerem que os alimentos avaliados são potencialmente perigosos à saúde humana e necessitam de medidas urgentes em relação ao controle sanitário da qualidade, sob o risco de num futuro próximo contribuir para a disseminação das denominadas doenças emergentes (MARTINS et al., 2002).

Trabalhos como de JOHNSON et al. (2003 e 2005) também alertam para a presença de patógenos resistentes em alimentos. Também BOU et al. (2002) alertam para o fato de plasmídeos de resistência serem disseminados entre diferentes cepas de *E. coli*. WINOKUR et al. (2001) ao analisarem plasmídeos de resistência em *E. coli* e *Salmonella* isoladas de alimentos de origem animal e humano verificaram que determinados fragmentos do material genético conservavam plasmídeos idênticos identificados nas duas espécies bacterianas sugerindo a transferência de resistência antimicrobiana entre espécies diferentes, fato importante, pois isto poderia estar ocorrendo em nível intestinal ao consumir um alimento contaminado.

Na detecção de genes *stx* 1 e *stx* 2 foram identificadas 4 cepas STEC (TABELA 5 e FIGURA 5), duas delas provenientes de um mesmo açougue, mas em pontos de coleta diferentes, sendo uma da carne moída e outra do moedor. As outras duas foram provenientes de locais diferentes sendo uma de carne moída e outra de moedor, mas de estabelecimentos comerciais diferentes. Todas elas possuíam o gene *stx* 2.

Cepas STEC fazem parte da microbiota gastrointestinal de bovinos produzidos para alimentação (carne). Como sempre há a possibilidade de transferência de material fecal para a carcaça durante a matança, existe o potencial de contaminação da carne por estas bactérias (ELDER et al., 2000). Também existe a possibilidade de contaminação cruzada da carne e equipamentos durante o processamento da carne (ASLAM et al., 2004). Ambas situações são de interesse público, pois é grande a possibilidade de contaminação de carne consumida pela população humana.

TABELA 5 - STEC isoladas de estabelecimentos comerciais no município de Taquaritinga – SP, no período de março de 2004 a janeiro de 2005.

Origem	Nº de cepas analisadas	Nº de cepas positivas (%)	Genótipo <i>stx</i>
Carne moída	91	2 (2,1)	<i>stx</i> 2
Mãos de manipuladores	42	0 (0.0)	-
Moedor de carne	154	2 (1,2)	<i>stx</i> 2

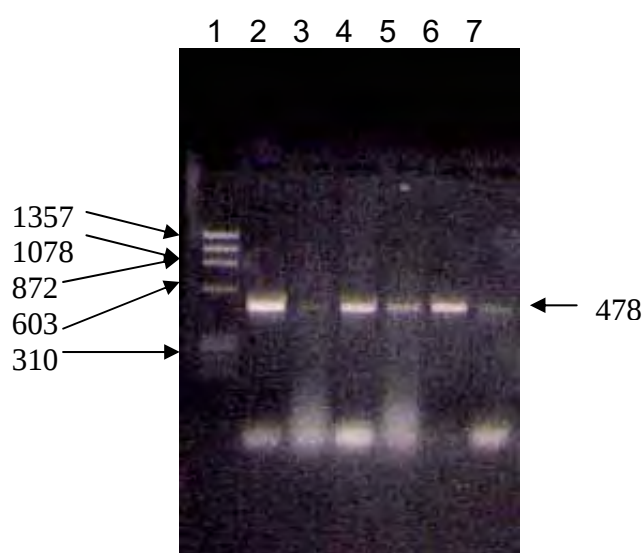


FIGURA 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% de produto de PCR para detecção de *stx* 1 e *stx* 2.

Canaleta 1 – marcador de peso molecular ϕ x174 *Hae* III digest; Canaleta 2 – *E. coli* J2 produtora de *stx* 2 Departamento de Microbiologia de IB – UNICAMP, Canaleta 3 – diluição 1/100; Canaleta 4 – cepa 393 (moedor de carne); Canaleta 5 – cepa 426 (carne moída); Canaleta 6 – cepa 530 (moedor de carne); Canaleta 7 – cepa 883 (carne moída).

Neste estudo, todas as cepas isoladas STEC apresentaram o gene *stx* 2. Estes resultados são consistentes com relatos anteriores do Brasil onde o gene *stx* 2 foi encontrado como sendo mais prevalente do que *stx* 1 em isolados de bovinos (LIRA et al., 2004; IRINO et al., 2005), também concordam com relatos da Argentina (PADOLA et al., 2004).

A *E. coli* produtora de toxinas é um importante microrganismo causador de toxinfecção alimentar (BOPP et al., 2003, PABST et al., 2003, MAKINO et al., 2003). *E. coli* Shiga toxigênica (STEC) tem sido reconhecida como agente causador de doenças humanas severas incluindo desde diarreia leve a severa sanguinolenta (colite hemorrágica), síndrome hemolítica (HUS) e falência renal (PATON & PATON, 1998; HUSSEIN & BOLLINGER, 2005).

As cepas STEC associadas freqüentemente a doenças clínicas nos Estados Unidos e Europa é o sorotipo O₁₅₇:H₇ (NATARO & KAPER, 1998; CAPRIOLI et al., 2005). Entretanto, vários outros sorotipos são comumente associados com surtos severos e, em alguns países, são isolados de casos clínicos mais do que a O₁₅₇ (NATARO & KAPER, 1998; LAW, 2000).

No presente trabalho não foi detectado o sorotipo O₁₅₇, sendo as cepas analisadas classificadas como STEC não-O₁₅₇.

Os bovinos são considerados reservatórios primários de STEC O₁₅₇ e não-O₁₅₇ (BETTELHEIM, 2000). Infecções humanas severas têm sido vinculadas à presença de STEC em carne moída mal cozida (HUSSEIN & BOLLINGER, 2005). Durante o processamento, a contaminação fecal da carcaça ou transferência de bactéria encontrada no couro do animal para a carcaça pode facilitar a transmissão de STEC dentro da cadeia alimentar (ELDER et al., 2000; CAPRIOLLI et al., 2005). Tal fato indica falhas higiênicas durante o processamento dos alimentos e possibilidade em potencial de veiculação de enteropatógenos e o risco em potencial ao consumidor.

HUSSEIN & BOLLINGER (2005) apresentaram uma revisão sobre a presença de STEC em carne; os autores relataram a presença rara de STEC não-O₁₅₇ de 1,7% a 58,0% em amostras de carne obtida nas indústrias de embalagem da carne e de 3,0% a 62,5% em amostras de supermercado, sendo que os EUA, Inglaterra, Canadá e Índia

apresentavam uma alta frequência de isolamento. Neste estudo a prevalência de STEC foi de 1,39%, sendo menor do que o relatado por IRINO et al., 2005.

Nenhuma cepa STEC apresentou o gene *eae* (intimina). Resultado semelhante foi obtido por DOMINGUE et al. (2003) ao analisarem amostras humanas (síndrome urêmica hemolítica e colite hemorrágica) e de carne, onde todas cepas foram negativas para intimina. FRIEDRICH et al. (2003) detectaram este mesmo gene associado com doenças em humano, como a Síndrome Urêmica Hemolítica, mas estava presente também em indivíduos assintomáticos. GALLAND et al. (2001), ao estudarem *E. coli* O₁₅₇:H₇ isoladas de carne bovina, puderam verificar que 26 de seus isolados possuíam o gene *eaeA*.

O modelo de resistência entre as STEC isoladas está apresentado na TABELA 6. Um dos isolados, cepa 530, exibiu resistência a 7 antimicrobianos, enquanto que a cepa 426 foi sensível a todas as drogas testadas.

TABELA 6 - Padrão de resistência encontrada entre as cepas STEC isoladas de estabelecimentos comerciais no município de Taquaritinga – SP, no período de março de 2004 a janeiro de 2005.

Número da Cepa	Origem	Resistotipos
426	Carne	Nenhum *
393	Moedor de carne	amox **
883	Carne	nalid; cef; amox; tet
530	Moedor de carne	cipro; amic; amp; nalid; cef; amox; tet

*- susceptibilidade para todos antibióticos testados

** - resistência: amox-amoxicilina; nalid-ácido nalidíxico; cef-cefalotina; tet-tetraciclina; cipro-ciprofoxacina; amic-amicacina; amp-ampicilina

Dois dos isolados, cepa 393 e 426, são provenientes do mesmo açougue, um de carne moída e o outro de moedor de carne. Considerando seus padrões de resistência é possível verificar que elas são similares, diferenciando somente pela resistência a um

antimicrobiano (TABELA 6), na verdade classificada como nível intermediário. Estudos anteriores têm sugerido que a limpeza inadequada do moedor de carne pode resultar na contaminação da carne moída com *E. coli* (FARREL et al., 1998) apesar do fato que a maioria dos regulamentos estabelece a necessidade da limpeza adequada dos equipamentos. A contaminação cruzada de equipamento por *E. coli* durante o processamento já foi estudada (ASLAM et al., 2004). WARRINER et al (2002) demonstraram que alguns clones de *E. coli* foram isolados de carcaça suína e equipamentos durante o processamento da carcaça, comprovando a possibilidade de contaminação cruzada, o que é razão de preocupação, pois há a possibilidade de bactéria patogênica ser disseminada através do alimento para consumo humano.

A emergência e disseminação de resistência antimicrobiana entre as cepas de *E. coli*, especialmente as cepas STEC de bovinos poderia ter implicação clínica negativa para humanos, pois existe o risco em potencial da transferência dos genes de resistência para as bactérias do intestino humano, deste modo a fiscalização contínua do aparecimento de resistência antimicrobiana entre patógenos zoonóticos presentes em alimentos, incluindo STEC, é necessária para assegurar a saúde pública. Inicialmente, STEC O₁₅₇:H₇ era encontrada susceptível a muitos antimicrobianos (SCHMIDT et al., 1998). Entretanto, estudos recentes têm documentado um aumento da resistência antimicrobiana entre STEC O₁₅₇:H₇ e especialmente entre STEC não-O₁₅₇ (GALLAND et al., 2001; KHAN et al., 2002).

A respeito do baixo número de amostras STEC isoladas neste estudo (n = 4) o padrão de resistência de algumas cepas (TABELA 6) mostrou resistência para quatro ou mais antibióticos, o que coincide com um relato recente de MORA et al. (2005), o qual descreveu que entre 581 cepas STEC não-O₁₅₇ analisadas, 239 (41.0%) foram resistentes a mais de um dos antimicrobianos testados e a resistência múltipla foi encontrada em 92,0% destas amostras, com 71 cepas mostrando resistência para cinco ou mais agentes antimicrobianos. A resistência antimicrobiana de bactérias em alimentos pode servir como uma fonte de genes de resistência, a qual poderia ser transferida para a microbiota intestinal humana (WINOKUR et al., 2001). Estratégias de

controle deveriam ser introduzidas pelas autoridades veterinárias para a proteção da saúde pública.

Medidas como capacitação dos manipuladores para obter noções quanto a veiculação de enfermidades por alimentos e trabalho de conscientização quanto a correta higienização de maquinário é importante, pois a peculiaridade deste quanto a dificuldade de sua higienização favorece a permanência do microrganismo no local e a veiculação deste agente pela carne que passar por este equipamento.

6. CONCLUSÕES

Portanto, concluímos neste trabalho:

- alto isolamento de *E. coli* do moedor de carne, carne moída, seguido pelas mãos dos manipuladores;
- elevada resistência frente a tetraciclina (76,6%), amoxicilina (64,1%), cefalotina (58,8%) e estreptomicina (51,2%);
- a resistência múltipla foi mais freqüente para três (47 cepas), quatro (43 cepas) e cinco (39 cepas) antimicrobianos;
- não foi isolada *E. coli* produtora de *stx* 1;
- foi detectado gene *stx* 2 em 4 cepas de STEC não-O₁₅₇, onde 2 foram isoladas de carne moída e 2 de moedor de carne, sendo 2 (uma de carne e uma de moedor) isoladas do mesmo estabelecimento comercial;
- o gene da intimina (*eae*) não foi detectado em nenhuma cepa;
- duas cepas STEC apresentaram multirresistência;
- não foi isolada cepa de *E. coli* O₁₅₇.
- a carne moída e o moedor de carne mal higienizado são importantes meios de veiculação de *E. coli* no comércio varejista.

7. REFERÊNCIAS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Estatística**. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/index_flash.html>. Acesso em: 02 set. 2006.
- ADWAN, G.M., ADWAN, K.M. Isolation of shiga toxigenic *Escherichia coli* from raw beef in Palestine. *International Journal of Food Microbiology*, v. 97, p. 81-84, 2004.
- AKTAN, I., SPRIGINS, K.A., LA RAGIONE, R.M., FAULKNER, L.M., PAIBA, G.A., WOODWARD, M.J. Characterization of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. *Veterinary Microbiology*, v. 102, p. 43-53, 2004.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION Committee on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association, 1992, 701p.
- ARCHER, G.L., CLIMO, M.W. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, n. 10, p. 2231-2237, 1994.
- ARTHUR, T.M., BARKOCY-GALLAGHER, G.A., RIVERA-BETANCOURT, M., KOOHMARAIE, M. Prevalence and Characterization of non-O₁₅₇ Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 10, p. 4847-4852, 2002.
- ASLAM, M., GREER, G.G., NATTRESS, F.M., GILL, C.O., McMULLEN, L.M. Genotypic analysis of *Escherichia coli* recovered from product and equipment at a beef packing plant. *Journal of Applied Microbiology*, v. 97, p. 78-86, 2004.

- ATLAS, R.M. *Principles of Microbiology*, 2 ed., New York: Mc Graw-Hill, 1996, 1298p.

- AVERY, S.M., LIEBANA, E., REID, C.A., WOODWARD, M.J., BUNCIC, S. Combined Use of two genetic fingerprinting methods, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Ribotyping, for characterization of *Escherichia coli* O₁₅₇ isolates from food animals, retail meats and cases of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n 8, p. 2806-2812, 2002.

- BERNARDI, E., ARMAS, R.D., CALDEIRA, M.F., RIBEIRO, G.A. Caracterização microbiológica e sorológica de linhagens de *E. coli* isoladas de carne moída comercializada em Pelotas-RS. *Higiene Alimentar*, v. 18, n 125, p 82-86, 2004.

- BETTELHEIM, K.A. Role of non-O157 VTEC. *Journal Applied Microbiology*, v. 88, p. 38S-50S, 2000.

- BLANCO, M., BLANCO, J.E., MORA, A., REY, J., ALONSO, J.M., HERMOSO, M., HERMOSO, J., ALONSO, M.P., BAHBI, G., GONZÁLEZ, E.A., BERNÁRDEZ, M.I., BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 1351-1356, 2003.

- BLANCO, M., PADOLA, N.L., KRÜGER, A., SANZ, M.E., BLANCO, J.E., GONZÁLEZ, E.A., DAHBI, G., MORA, A., BERNARDEZ, M.I., ETCHEVERRÍA, A.I., ARROYO, G.H., LUCCHESI, P.M.A., PARMA, A.E., BLANCO, J. Virulence genes and intimin types of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology*, v. 7, p 269-276, 2004.

- BONARDIS, S., MAGGI, E., BOTTARELLI, A., PACCIARINI, M.L., ANSUINI, A., VELLINI, G., MORABITO, S., CAPRIOLI, A. Isolation of verocytotxin-procuding

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

- BOPP, D.J., SAUDERS, B.D, WARING, A.L., ACKELSBERG, J., DUMAS, N., BRAUN-HOWLAND, E., DZIEWULSKI, D., WALLACE, B.J., KELLY, M., HALSE, T., MUSSER, K.A., SMITH, P.F., MORSE, D.L., LIMBERGER, R.J. Detection, isolation and molecular subtyping of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 1, p 174-180, 2003.

- BOU, G., CARTELLE, M., TOMAS, M., CANLE, D., MOLINA, F., MOUER, R., EIROS, J.M., GUERRERO, A., Identification and Broad Dissemination of the CTX-M-14 β -lactamase indifferent *Escherichia coli* Strains in the Northwest Area of Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 11, p 4030-4036, 2002.

-BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Estabelece o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 08 set. 1997, Seção 1, p. 19697.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 46, de 10 de fevereiro de 1998. Estabelece o Manual Genérico de Procedimentos para APPCC em Indústrias de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, 16 mar. 1998, Seção 1, p. 24.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, 22 dez. 1999, Seção 1, p. 213.

- BRASIL. Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 10 jan. 2001, Seção 1.

- BRASIL. Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Estabelece o Regulamento Técnico de Procedimento Operacionais Padronizados Aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 06 nov. 2002.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**. Brasília, 18 set. 2003, Seção 1, p. 14.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 10, de 22 de maio de 2003. Institui o Programa Genérico de PROCEDIMENTOS - PADRÃO DE HIGIENE OPERACIONAL - PPHO, a ser utilizado nos Estabelecimentos de Leite e Derivados que funcionam sob o regime de Inspeção Federal, como etapa preliminar e essencial dos Programas de Segurança Alimentar do tipo APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). **Diário Oficial da União**. Brasília, 28 maio 2003, Seção 1, p. 4.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. Institui o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Bovina em Conserva (Corned Beef) e Carne Moída Bovina. **Diário Oficial da União**. Brasília, 24 nov. 2003, Seção 1, p. 29.

- BRASIL. Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**. Brasília, 16 set. 2004.

- BRETT, K.N., HORNITZKY, M.A., BETTELHEIM, K.A., WALKER, M.J., DJORDJEVIC, S.P. Bovine non-O₁₅₇ Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess stx₂-EDL933 and/or stx₂Vhb subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 6, p. 2716-2722, 2003.

- BROOKS, H.J.L., MOLLISON, B.D., BETTELHEIM, K.A., MATEJKA, K., PATERSON, K.A., WARD, V.K. Occurrence and virulence factors of non-O₁₅₇ Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. *Letters in Applied Microbiology*, v. 32, p. 118-122, 2001.

- CAPRIOLI, A., MORABITO, S., BRUGERE, H., OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, v. 36, p. 289-311, 2005.

- CARROLL, E.J. & JASPER, D.E. Distribution of Enterobacteriaceae in recycled manure bedding on California dairies. *Journal of Dairy Science*, v. 61, n. 10, p. 1498-1508, 1978.

- CARVALHO, A.C.F.B.; FLORIOTO, J.F.; PEREIRA, G.T.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Avaliação Microbiológica da Carne de Ave Mecanicamente Separada (CMS). *Higiene Alimentar*, v. 16, n 98, 2002.

- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Diseases & Conditions**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g.htm>. Acesso em: 24 abr. 2003.

- 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*, v. 70, p. 111-121, 1999.
- CHINA, B., PIRSON, V., MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, 3462-3465, 1996.
- COSTA, F.N., ALVES, L.M.C., MONTES, S.S. Avaliação das condições higiênico sanitárias de carne bovina moída, comercializada na cidade de São Luiz – MA *Higiene Alimentar*, v. 14, n 77, p. 49-52, 2000.
- COSTA, F.N.; LIMA, M.S.; RABELO, R.N. Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isolados de derivados lácteos. *Higiene Alimentar*, v. 16, n. 92/93, p. 80-83, 2002.
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. **Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar.** Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/shu_9802.ppt. Acesso em: 18 mar. 2006.
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. **Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar.** Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm >. Acesso em: 18 mar. 2006.
- DE MARTINIS, E.C.P. Segurança Microbiológica de alimentos: *Listeria monocytogenes* e bactérias lácticas. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2004, Tese de livre docência, 217p.

- DOMINGUE, G., WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R., PERRY, N., RADFOR, D., CHEASTY, T. DNA-based subtyping of verocytotoxin-producing raw meat sources. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37, p. 433-437, 2003.

- DONOHUE-ROLFE, A., KONDOVA, I., OSWALD, S., HUTTO, D., TZIPORI, S. *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ Strains that Express Shiga Toxin (Stx) 2 Alone are more neurotropic for gnotobiotic piglets that are isotypes producing only Stx1 or both Stx1 and Stx2. *The Journal of Infectious Diseases*, 181:1825-9, 2000.

- DONTOROU, C., PAPADOPOULOU, C., FILIOUSSIS, G., ECONOMOU, V., APOSTOLOU, I., ZAHHAS, G., SALAMOURA, A., KANSOUZIDOU, A., LEVIDIOTOU, S. Isolation of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, v. 82, p. 273-279, 2003.

- DOYLE, M.P. & SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ from Retail Fresh Meats and Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 10, p 2394-2396, 1987.

- DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 12, n. 4, p 289-301, 1991.

- EKLUND, M., LEINO, K., SIITONEN, A. Clinical *E. coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx positive virulence profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 12, p. 4585-4593, 2002.

- 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. *PNAS*, v. 97, n. 7, p 2999-3003, 2000.

- ELLEBRACHT, E.A., CASTILLO, A., LUCIA, L.M., MILLER, R.K., ACUFF, G.R. Reduction of Pathogens using hot water and lactic acid on beef trimmings. *Journal of Food Science*, v. 64, n 6, p 1094-1099, 1999.

- FARREL, A.B., RONNER, A.B., WONG, A.C.I. Attachment of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid. *Journal of Food Protection*, v. 61, p. 817-822, 1998.

- FERREIRA, M.G.A.B., SOBRINHO, A.J.C. Avaliação da Qualidade Bacteriológica das Carnes Bovina Moída e Suína (Pernil) *in natura* e/ou refrigerada, em supermercados, frigoríficos e feiras livres do município de São Luiz, MA. *Higiene Alimentar*, v 17, nº 104/105, p. 87-93, 2003.

- FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2003, 182p.

- FRIEDRICH, A.W., BORELL, J., BIELASZEWSKA, M., FRUTH, A., TSCHÄPE, H., KARCH, H. Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic Characterization and association with human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 6, p. 2448-2453, 2003.

- GALLAND, J.C., HYATT, D.R., CRUPPER, S.S., ACHESON, D.W. Prevalence antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157: H7 isolates from a longitudinal study of beef feedlots. *Applied Environmental Microbiology*, v. 67, p. 1619-627, 2001.

- GERMANO, P.M.L.& GERMANO, M.I.S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. Livraria Varela, São Paulo, 2º edição, 2003, 655p.

- GIAMMANCO, G.M., PIGNATO, S., GRIMONT, F., GRIMONT, P.A.D., CAPRIOLI, A., MORABITO, S., GIAMMANCO, G. Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ Isolated in Italy and in France. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 12, p 4619-4624, 2002.

- GHILARDI, A.C.R. Características de virulência e análise clonal de amostras de *E. coli* dos sorogrupos O₁₄₂, O₁₂₇ e O₈₆. *Rev Inst. Adolfo Lutz*, v. 59 (1/2), p. 57-58, 2000.

- GUYOT, A., BARRETT, S.P., THRELFALL, E.J., HAMPTON, M.D., CHEASTY, T. Molecular epidemiology of multi-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Hospital Infection*, v. 43, p 39-48, 1999.

- HEUVELINK, A.E., ROESSINK, G.L., BOSBOOM, K., BOER, E. Zero-tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O₁₅₇ VTECinfections. *International Journal of Food Microbiology*, v. 66, p. 13-20, 2001.

- HOFFMAN, F.L.; MANSOR, A.P.; COELHO, A.R.; VINTURIM, T.M. Microbiologia de carcaças e carnes mecanicamente separadas (CMS), obtidas em abatedouro de aves da Região de São José do Rio Preto – SP. *Higiene Alimentar*, v. 16, n 92/93, p. 45-50, 2002.

- HUSSEIN, H.S., BOLLINGER, L.M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Meat Science*, v. 71, p. 676-689, 2005.

- IRINO, K., KATO, M.A.M.F., VAZ, T.M.I., RAMOS, I.I., SOUZO, 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*, v. 105, p. 29-36, 2005.

- JACOBY, G.A., ARCHER, G.A. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New England Journal of Medicine*, v. 324, n. 9, p. 601-612, 1991.

- JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*, 6ª edição, An Aspen Publication, 2000, 679p.

- JENKINS, C., CHART, H., CHEASTY, T., WILLSHAW, G.A., PEARCE, M.C., FOSTER, G., GUNN, G.J., SMITH, H.R., DOUGAN, G., SYNGE, B.A., FRANKEL, G. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O₁₅₇ Scottish Cattle. *The Veterinary Record*, p 58-60, 2002.

- JOHNSON, J.R., GAJEWSKI, A., LESSE, A.J., RUSSO, T.A. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 5798-5802, 2003.

- JOHNSON, J.R., KUSKOWSKI, M.A., SMITH, K., O'BRYAN, T.T., TATINI, S. Antimicrobial-Resistant and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Retail Foods. *Journal of Infectious Diseases*, v. 191, 1040-1049, 2005.

- KESKIMAKI, M., MATTILA, L., PELTOLA, H., SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 40, p. 151-156, 2001.

- KHAN, A., YAMASAKI, S., SATO, T., RAMAMURTHY, T., PAL, A., DATTA, S., CHOWDHURY, N.R., DAS, S.C., SIKDAR, A., TSUKAMOTO, T., BHATTACHARYA, S.K., TAKEDA, Y., NAIR, G.B. Prevalence and Genetic Profiling of Virulence Determinants of non-O₁₅₇ Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef, and humans, Calcutta, India. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n 1, p 54-62, 2002.

- LAGAGGIO, V.R.A.; FLORES, M.L.; SEGABINAZI, S.D. Avaliação Microbiológica da superfície de Mãos dos Funcionários do Restaurante Universitário, da universidade Federal de Santa Maria – RS. *Higiene Alimentar*, v. 16, n 100, p. 107-110, 2002.
- LÁZARO, N.S., FARIAS, R.S., HOFER, D.P.R.E. *Enterobacteriaceae* oriundas de fontes humanas e animal: produção de enterotoxina termoestável e nível de resistência a antimicrobianos. *Higiene Alimentar*, v. 13, n 64, p. 49-57, 1999.
- LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal Applied Microbiology*, v. 88, p. 729-745, 2000.
- LIEBANA, E., SMITH, R.P., LINDSAY, E., McLAREN, I., CASSAR, C., CLIFTON-HADLEY, F.A., PAIBA, G.A. Genetic diversity among *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ isolates from bovines living on farms in England and Wales. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 8, p 3857-3860, 2003.
- LIPMAN, L.J.A., NIJS, A. de, GAASTRA, W. Isolation and identification of fimbriae and toxin production by *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 47, p. 1-7, 1995.
- LIRA, M.W., MACEDO, C., MARIN, J.M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, v. 97, 861-866, 2004.
- LOGUERCIO, A.P.; SILVA, W.P.; ALEIXO, J.A.G. Condições Higiênico-sanitárias no Processamento de Carne Bovina Moída. *Higiene Alimentar*, v. 16, n 98, p. 63-66, 2002.
- MAINIL, J. G., JACQUEMIN, E., POHL, P., FAIRBROTHER, J.M., ANSUINI, A., LE BOUGUÉNEC, CH, BALL, H.J., DE RYCKE, J., OSWALD, E. Comparison of necrotoxigenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. *Veterinary Microbiology*, v. 70, p. 123-135, 1999.

- MAKINO, S.I., TOBE, T., ASAKURA, H., WATARAI, M., IKEDA, T., TAKESHI, K., SASAKAWA, C. Distribution of the secondary type III secretion system locus found in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ isolates among shiga toxin-producing *E. coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 6, p. 2341-2347, 2003.

- MARTINS, S.C.S.; ALBUQUERQUE, L.M.B.; SERIO, J.; MATTEI, A.C.M.L.; RODRIGUES, M.S.V. Avaliação Microbiológica de Pontos Críticos de Controle no Fluxograma de Preparação de Carne Bovina em Unidade de Nutrição. *Higiene Alimentar*, v. 15, n 88, p. 84-89, 2001.

- MARTINS, S.C.S.; LIMA, J.R.; ALMADA, J.S.; PEREIRA, A.I.B. "Screening" de linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal no Estado do Ceará, Brasil. *Higiene Alimentar*, v. 17, nº 104/105, janeiro/fevereiro, p. 71-76, 2002.

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

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

- MIDGLEY, J. & DESMARCHELIER, P. Pre-slaughter handling of cattle and shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Letters in Applied Microbiology*, v. 32, p 307-311, 2001.

- MORA, A., BLANCO, J.E., BLANCO, M., ALONSO, M.P., DHABI, G., ECHEITA, A., GONZÁLEZ, E.A., BERNÁRDEZ, M.I., BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ and non-O₁₅₇ strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology*, 2005.
- NASCIMENTO, A.R., VALLE, R.H.P., BOARI, C.A., ALCÂNTARA, E.M.C., VIEIRA, R.H.S.F. Avaliação da Presença de *Salmonella* e de outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* em massa de quibe comercializada na cidade de Lavras, MG. *Higiene Alimentar*, v. 16, p 85-88, nº 102-103, 2002.
- NATARO, J.P., KAPER, J.B. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 11, p. 142-201, 1998.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-Fifth Edition, v. 20, n. 2, 2000.
- OLIVEIRA, L.A.T., FERREIRA, T., FRANCO, R.M., CARVALHO, J.C.A.P. Enumeração de *Escherichia coli* e *Enterococcus* em amostras de hambúrguer de frango, comercializadas em Niterói – RJ. Avaliação de sensibilidade à antimicrobianos das cepas isoladas. *Higiene Alimentar*, v. 13, n 63, p. 49-55, 1999.
- OLIVEIRA, N.M.S., NASCIMENTO, L.C., FIORINI, J.E. Isolamento e identificação de bactérias facultativas mesofílicas em carnes frescas bovinas e suínas. *Higiene Alimentar*, v. 16, n 94, p. 68-74, 2002.
- OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. **Publicações**. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/Guiaaliment.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2006.

- ORDEN, J.A., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A., CID, D., GARCIA, S., SANZ, R., DE LA FUENTE. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1-30 days old diarrhoeic dairy calves. *Veterinary Microbiology*, v. 63, p. 239-248, 1998.

- PABST, W.L., ALTWERGG, K., KIND, D., MIRJANIC, S., HARDEGGER, D., NADAL, D. Prevalence of Enteraggative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 6, p. 2289-2293, 2003.

- PADOLA, N.L., SANZ, M.E., BLANCO, J.E., BLANCO, M., BLANCO, J., ETCHERRIA, A.I., ARROYO, G.H., USERA, M.A., PARMA, A.E. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Veterinary Microbiology*, v. 100, p. 3-9, 2004.

- PAGANI, L., DELL'AMINO, E., MIGLIVACCA, R., D'ANDREA, M.M., GIACOBONE, E., AMICOSANE, G., ROMERO, E., ROSSOLINI, G.M. Multiple CTX-M-Type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 9, p 4264-4269, 2003.

- PALERMO NETO, J. Resíduos de Antimicrobianos em Alimentos. *Revista CFMV*, ano II, n. 22, p. 65-71, 2001.

- PALUMBO, S.A., KLEIN, P., CAPRA, J., EBLEN, S., MILLER, A.J. Comparison of excision and swabbing sampling methods to determine the microbiological quality of swine carcass surfaces. *Food Microbiology*, v. 16, p. 459-464, 1999.

- PATON, J.C., PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Review*, v. 11, p. 450-479, 1998.

- PELCZAR Jr, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. 2ª edição, v. 2, Makron Books, 1996, 517p.

- PEREIRA, S.C., MACULEVICIUS, J. Estudo da temperatura dos alimentos no sistema de distribuição centralizada: Análises Estatísticas dos Pontos Críticos de Controle Qualidade Final do Produto. *Higiene Alimentar*, v. 13, n 64, p. 9-18, 1999.

- PESSANHA, R.P., GONTIJO FILHO, P.P. Antimicrobial use as growth promoters and resistance for isolates of *Escherichia coli* and of *Enterobacteriaceae* lactose negative of the fecal microflora of broiler chickens. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, 2001. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100018&lng=en&nrm=iso>. Access on: 02 Sep 2006. doi: 10.1590/S0102-09352001000100018.

- PIGATTO, C.P. & BARROS, A.R. Qualidade da carne moída bovina resfriada, comercializada em açougues da região de Curitiba. *Higiene Alimentar*, v. 17, n. 108, p. 53-57, 2003.

- PRATA, L.F. *Manual de enfermidades transmitidas por alimentos*. FUNEP, 1999, 212p.

- RADU, S., MUTALIB, S.A., RUSUL, G., AHMAD, Z., MORIGAKI, T., ASAI, N., KIM, Y.B., OKUDA, J., NISHIBUCHI, M. Detection of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ in the beef marketed in Malaysia. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 1153-1156, 1998.

- RANDALL, L.P., WRAY, C., DAVIES, R.H. Survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O₁₅₇ under simulated farm conditions. *The Veterinary Record*, v. 145, n. 500-501, 1999.

- REINDERS, R.D., WEBER, M.F., LIPMAN, L.J.A., VERHOEFF, J., BIJKER, P.G.H. Control of VTEC in Dutch livestock and meat production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 66, p. 79-83, 2001.

- RIBEIRO, A.C., REIS, D.O., ROSSI, D.A. Procedimento de Higienização na redução do nº de microrganismos das mãos de manipuladores, em uma indústria frigorífica. *Higiene Alimentar*, v. 14, n 70, p. 52-57, 2000.

- RICHARDS, M.S., CORKISH, J.D., SAYERS, A.R., McLARE, I.M., EVANS, S.J., WRAY, C. Studies of the presence of verocytotoxic *Escherichia coli* O₁₅₇ in bovine faeces submitted for diagnostic purposes in England and Wales and on beef carcasses in abattoirs in the United Kingdom. *Epidemiology and Infection*, v. 120, p. 187-192, 1998.

- RIEDEL, G. *Controle Sanitário dos Alimentos*, 2ª edição, São Paulo: Atheneu, 1992, 320p.

- RUIZ, J., SIMON, K., HORCAJADA, J.P., VELASCO, M., BARRANCO, M., ROIG, G., MORENO-MARTINEZ, A., MARTINEZ, J.A., ANTA, T.J., MENSA, J., VILA, J. Differences in virulence factores among clinical isolates of *E. coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 12, p. 4445-4449, 2002.

- SÁENZ, Y., ZARAZAGA, M., BRINAS, L., LANTERO, M., RUIZ-LARREA, F., TORRES, C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 18, 353-358, 2001.

- SÃO PAULO (Estado). Secretaria Estadual da Saúde. Decreto nº 12342, de 27 de setembro de 1978. Dispõe sobre normas de promoção, preservação e recuperação da saúde no campo de competência da Secretaria de Estado da Saúde. Disponível em:

<<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/download.asp?tipo=zip&arquivo=78de12342.zip>>.

Acesso em 26 mar. 2006.

- SÃO PAULO (Estado). Secretaria Estadual da Saúde. Portaria CVS 06/99, de 10 de março de 1999. Regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. Disponível em: <<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/download.asp?tipo=zip&arquivo=99pcvs6.zip>>. Acesso em: 26 mar. 2006.

- SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Saúde e Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Resolução Conjunta SS/SAA – 01, de 26 de dezembro de 2001. Estabelece a capacitação dos manipuladores em comércio varejista de carnes. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**. 27 dez. 2001, Volume 111, nº 243.

- SAVAGE, J., CHASE Jr, T., MACMILLAN, J.D. Population changes in enteric bacteria and other microorganisms during aerobic thermophilic window composting. *Applied Microbiology*, v. 26, n. 6, p. 969-974, 1973.

- SCHMIDT, H., von MALDEGHEM, J., FROSCHE, M., KARCH, H. Antibiotic susceptibilities of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 during 1996. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*, v. 42, p. 548-550, 1998.

- SCHROEDER, C.M., WHITE, D.G., GE, B., ZHANG, Y., McDERMOTT, P.F., AYERS, S., ZHAO, S., MENG, J. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. *International Journal of Food Microbiology*, v. 85, 197-202, 2003.

- SCOTT, T.M., ROSE, J.B., JENKINS, T.M., FARRAH, S.R., LUKASIK, J. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 12, p. 5796-5803, 2002.

- SHEN, D., BIEDENBACH, D.J., WINOKUR, P.L., PFALLER, M.A., JONES, R.N. Phenotypic and Genotypic characterizations of Chinese Strains of *Escherichia coli* Producing Extended-Spectrum β -lactamases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 34, p. 159-164, 1999.
- SIDJABAT-TAMBUNAN, H., BENSINK, J.C., BETTELHEIM, K.A. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* from mutton carcasses. *Aust Vet J.*, v. 76, n. 5, p 364-365, 1998.
- SILVA, J.A.; AZEVEDO, G.A.; BARROS, C.M.R.; COSTA, E.L.; FALCÃO, M.M.S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. *Higiene Alimentar*, v. 16, n 100, p. 97-101, 2002.
- SOARES, M.A. Educação Continuada à Distância, Resistência Antibiótica. *Pharmacia Brasileira*, ano III, n. 24, p. 59-62, 2001.
- SPERS, E.E. Mecanismo de regulação da qualidade e segurança em alimentos. São Paulo, FEA/USP, 2003, tese de doutorado, 136p.
- TAVARES, W. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos*, 2ª ed., Atheneu, 1999, 792p.
- TESSARI, E.N.C., CARDOSO, A.L.S.P., CASTRO, A.G.M., ZANATTA, G.F. Prevalência de *Salmonella enteritidis* em carcaças de frango industrialmente processadas. *Higiene Alimentar*, v. 17, nº 107, p. 52-55, 2003.
- TRABULSI, L.R. *Microbiologia*, 3ª ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 1999, 586p.
- UNGAR, M.K., GERMMANO, M.I.S., GERMANO, P.M.L. Riscos e Conseqüências da Manipulação de Alimentos para a Saúde Pública. *Higiene Alimentar*, v.6, n.2 1992.

- USP – Universidade de São Paulo. **Agência USP de Notícias**. Disponível em: www.usp.br/agen/rede389.htm. Acesso em: 24 abr. 2003.

- WANG, G., CLARK, C.G., RODGERS, F.G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O₁₅₇:H₇ serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 10, p. 3613-3619, 2002.

- WARRINER, K., ALDSWORTH, T.G., KAUR, S., DODD, C.E.R. Cross-contamination of carcasses and equipment during pork processing. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 169-177, 2002.

- WASTESON, Y., JOHANNESSEN, G.S., BRUHEIM, T., URDAHL, A.M., O'SULLIVAN, K., RORVIK, L.M. Fluctuations in the occurrence of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ on a Norwegian farm. *Letters in Applied Microbiology*, v. 40, p. 373-377, 2005.

- WHITE, D.G., HUDSON, C., MAURER, J.J., AYERS, S., ZHAO, S., LEE, M.D., BOLTON, L., FOLEY, T., SHERWOOD, J. Characterization of Chloramphenicol and Florfenicol Resistance in *Escherichia coli* Associated with Bovine Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 12, p. 4593-4598, 2000.

- WINOKUR, P.L., VONSTEIN, D.L., HOFFMAN, L.J., UHLENHOPP, E.K., DOERM, G.V. Evidence for Transfer of CMY-2 AmpC β -lactamase Plasmids between *Escherichia coli* e *Salmonella* Isolates from Food Animals and Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 10, p. 2716-2722, 2001.

- ZWEIFEL, C., ZYCHOWSKA, M.A., STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Campylobacter* spp isolated from slaughtered sheep in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, v. 92, p. 45-53, 2004.

APÊNDICE

MEIOS DE CULTURA

Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB)

COMPOSIÇÃO (g/L)

Ágar bacteriológico.....	13,5
Azul de metileno.....	0,065
Eosina Y.....	0,4
Fosfato bibásico de potássio.....	2,0
Lactose.....	5,0
Peptona de gelatina.....	10,0
pH final: 7,2 ± 0,2 a 25°C	

Dissolver 36g em 1 litro de água destilada. Hidratar 10-15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente e ferver por 1 minuto. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Distribuir 15-20 ml por placa de Petri esterilizada.

Usado como meio clássico para o isolamento e diferenciação de enterobactérias. Neste meio a combinação de eosina e azul de metileno como indicador promovem uma diferenciação distinta entre as colônias de organismos fermentadores da lactose e dos que não fermentam. A sacarose foi incluída no meio para detectar os membros do grupo coliforme que fermentam este carboidrato mais rápido que a lactose. As colônias fermentadoras de lactose são negras ou possuem centros negros com periferia transparente, ao passo que as que não fermentam lactose ou a sacarose são incolores. O meio é ligeiramente inibidor para organismos gram positivos.

No caso, a *Escherichia coli* apresenta colônias elevadas ou ligeiramente convexas, de 2 a 3 mm de diâmetro. Apresentam à luz transmitida um centro negro com borda estreita e clara e brilho metálico azul-esverdeado à luz refletida.

Caldo *Escherichia coli* (Caldo EC)

COMPOSIÇÃO (g/L)

Cloreto de sódio.....	5,0
Fosfato bibásico de potássio.....	4,0
Fosfato monobásico de potássio.....	1,5
Lactose.....	5,0
Peptona de caseína.....	20,0
Sais biliares nº 3.....	1,5

pH final: $6,9 \pm 0,2$ a 25°C

Dissolver 37g em 1 litro de água destilada. Hidratar por 10-15 minutos. Aquecer ligeiramente, se necessário. Distribuir em tubos contendo tubos de Durhan. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Este meio é recomendado pela APHA para detecção e contagem do número mais provável (NMP) de coliformes fecais em águas, esgotos e alimentos.

Consiste de um caldo de lactose com adição de 0,15% de sais biliares que inibem o desenvolvimento da flora acompanhante dos coliformes e permite o crescimento de *Escherichia coli*. Este meio tem um forte sistema de tamponamento que controla o pH durante a fermentação. Pode ser incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para detecção de coliformes ou a $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$ para isolamento de *Escherichia coli*.

A *Escherichia coli* apresentam excelente crescimento com formação de gás.

Caldo Bile Verde Brilhante (CBVB)

COMPOSIÇÃO (g/L)

Bile bovina.....	20,0
Lactose.....	10,0
Peptona de gelatina.....	10,0
Verde brilhante.....	0,0133

pH final: $7,2 \pm 0,2$ a 25°C

Dissolver 40g em 1 litro de água destilada. Hidratar por 10-15 minutos. Aquecer ligeiramente, se necessário. Distribuir em tubos contendo tubos de Durhan. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Meio de cultura seletivo recomendado pela APHA para pesquisar coliformes em águas potáveis, de esgoto, leite, produtos lácteos e outros de importância sanitária.

A bile e o verde brilhante inibem o desenvolvimento da flora acompanhante dos coliformes. A presença de gás após incubação durante 24-48h é considerada como prova positiva para a presença do grupo *Escherichia coli* – *Enterobacter*.

Após incubação por 24-48h a 35 ± 2°C a *Escherichia coli* apresenta bom crescimento com formação de gás.

Caldo Lauril Sulfato de Sódio (CLSS)

COMPOSIÇÃO (g/L)

Cloreto de sódio.....	5,0
Fosfato bibásico de potássio.....	2,75
Fosfato monobásico de potássio.....	2,75
Lactose.....	5,0
Lauril sulfato de sódio.....	0,1
Peptona de caseína.....	20,0
pH final: 6,8 ± 0,2 a 25°C	

Dissolver 35,6g em 1 litro de água destilada. Aquecer ligeiramente, se necessário. Distribuir em tubos contendo tubos de Durhan. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Recomendado pela APHA para a detecção de coliformes em água, derivados de leite e outros alimentos usando técnicas do número mais provável (NMP).

A formação de gás em tubos de fermentação, dentro de 48 ± 3h de incubação a 35 ± 2°C, é evidência presuntiva da presença de microrganismos coliformes.

A *Escherichia coli* apresenta bom crescimento e formação de gás.

Ágar Luria Bertani (LB)**COMPOSIÇÃO (g/L)**

Triptona.....	10,0
Extrato de Levedura.....	5,0
Cloreto de sódio.....	10,0
Água destilada.....	1000,0mL
pH ajustado 7,0	

Aquecer agitando freqüentemente e ferver por 1 min. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Infusão Cérebro Coração (BHI)**COMPOSIÇÃO (g/L)**

Cloreto de sódio.....	5,0
Dextrose.....	2,0
Fosfato bibásico de sódio.....	2,5
Infusão de cérebro e coração.....	17,5
Peptona de carne.....	5,0
Peptona de caseína.....	5,0

Dissolver 37g em 1 litro de água destilada. Aquecer ligeiramente, se necessário. Distribuir 5 ml por tubo 15x125mm. Esterilizar a 121°C/15min.

Após incubação por 24-48h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Meio muito rico em nutrientes e especialmente útil para a cultura e desenvolvimento de germes delicados e difíceis.

Ágar Ferro Tríplice Açúcar (TSI)**COMPOSIÇÃO (g/L)**

Ágar bacteriológico.....	13,0
Cloreto de sódio.....	5,0
Dextrose.....	1,0
Lactose.....	10,0

Peptona de carne.....	10,0
Peptona de caseína.....	10,0
Sacarose.....	10,0
Sulfato de ferro II e amônio.....	0,2
Tiosulfato de sódio.....	0,2
Vermelho de fenol.....	0,025
pH final: $7,3 \pm 0,2$ a 25°C	

Dissolver 59,4g em 1 litro de água destilada. Hidratar por 10-15min. Aquecer agitando freqüentemente e ferver por 1 min. Distribuir 3 ml por tubo 13x100 mm. Esterilizar a 121°C/15min. Esfriar em posição inclinada, de modo que o meio no fundo do tubo alcance uma profundidade de 1,5-2,0 cm.

Meio diferencial recomendado para a identificação de bacilos entéricos, baseado na fermentação da glicose, lactose e sacarose e na produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S).

Sendo *E. coli* o meio apresentará a superfície e o fundo amarelo.

Ägar Citrato Simons

COMPOSIÇÃO (g/L)

Agar bacteriológico.....	15,0
Azul de bromotimol.....	0,08
Citrato de sódio.....	2,0
Cloreto de sódio.....	5,0
Fosfato bibásico de potássio.....	1,0
Fosfato monobásico de amônio.....	1,0
Sulfato de magnésio.....	0,2
pH final: $6,9 \pm 0,2$ a 25°C.	

Dissolver 24,2g em 1 litro de água destilada. Hidratar por 10-15min. Aquecer agitando freqüentemente e ferver por 1 min. Distribuir 5 ml por tubo 15x125mm. Esterilizar a 121°C/15 min. Esfriar em posição inclinada.

Usado para diferenciar e identificar enterobactérias, baseando-se na utilização do citrato como única fonte de carbono.

A reação aparece após incubação por 4 dias a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A *E. coli* é negativa, não apresentando crescimento.

Indol

ÁGUA PEPTONADA

Água destilada.....1000ml
 Cloreto de sódio.....5g
 Peptona.....10-20g

Dissolver todos ingredientes em água e distribuir em tubos.

REATIVO DE KOVACS

- 5g de paradimetilaminobenzaldeído em 75ml de álcool amílico.
- Dissolver a 60°C , 5 minutos
- Adicionar 25ml de HCl puro, densidade 1,12 (33-35%). Aparece uma cor vermelha.
- Deixar em repouso até que a cor mude para amarelo, o que ocorre e, 6-7horas. Estará então o reativo pronto para o uso.

Lisina

COMPOSIÇÃO (g/L)

Peptona.....5,0
 Extrato de levedura.....3,0
 Dextrose.....1,0
 Aminoácido Lisina.....5,0
 Indicador Púrpura de Bromocresol.....0,02
 Água destilada.....1000ml

Dissolver, distribuir em tubos de ensaio cerca de 1,5ml e autoclavar para esterilizar.

Agar uréia

COMPOSIÇÃO (g/L)

MEIO BASE

Peptona.....	1,0
Cloreto de sódio.....	5,0
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄).....	2,0
Glicose.....	1,0
Agar.....	15,0
Solução de vermelho de fenol a 0,2%.....	6ml
Água destilada.....	1000ml

URÉIA 40%

Uréia.....	40g
Água destilada esterilizada.....	100ml

Dissolver os ingredientes, com exceção da uréia, em 1 litro de água destilada. Ajustar o pH a 6,9. Autoclavar a 121°C/15min. Após o resfriamento, adicionar assepticamente, para cada 100ml do meio base, 5ml da solução Uréia 40%. Distribuir assepticamente porções de cerca de 3ml em tubos de ensaio e incliná-los.

A *E. coli* não apresenta alteração na coloração.

Agar Muller Hinton (MHM)

COMPOSIÇÃO (g/L)

Extrato de carne.....	3,00
Caseína hidrolisada.....	17,50
Amido solúvel.....	1,50
Ágar ágar.....	17,00

Água destilada suficiente para completar 1000 ml de meio de cultura.

Era colocado em erlenmeyer e levado para autoclavar por 15 minutos a 120° ± 1°C. Após autoclavado, eram distribuídos cerca de 30 ml do meio em cada placa de Petri.

QUADRO 1 - Número Mais Provável (NMP) por grama ou mL, para séries de 3 tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL.

Número de Tubos Positivos			NMP/g ou mL
0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3,0
0	0	1	3,0
0	1	0	3,0
0	1	1	6,1
0	2	0	6,2
0	3	0	9,4
1	0	0	3,6
1	0	1	7,2
1	0	2	11
1	1	0	7,4
1	1	1	11
1	2	0	11
1	2	1	15
1	3	0	16
2	0	0	9,2
2	0	1	14
2	0	2	20
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	3	0	29
2	3	1	36
3	0	0	23
3	0	1	38
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460

3	3	2	1100
3	3	3	>1100

Fonte: BRASIL, 2003.

QUADRO 2 – Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais por grama de Carne Moída de um total de 23 estabelecimentos comerciais no município de Taquaritinga – S.P., no período de março de 2004 a janeiro de 2005.

NMP/g	Coliformes Totais	Coliformes Fecais
>1100	9	4
1100	4	-
460	1	-
290	1	-
210	1	-
150	1	-
120	1	-
93	2	-
75	-	1
43	2	1
21	1	-
20	-	1
15	-	1
11	-	1
9,2	-	1
7,4	-	1
3,6	-	1
<3,0	-	11
TOTAL	23	23

QUADRO 3— Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais por swab das mãos dos manipuladores de 23 estabelecimentos comerciais no município de Taquaritinga – S.P., no período de março de 2004 a janeiro de 2005.

NMP/g	Coliformes Totais	Coliformes Fecais
>1100	5	1
1100	1	0
93	2	0
43	2	0
23	1	0
21	2	0
9,2	3	1
7,4	0	3
3,6	2	5
< 3,0	5	13
TOTAL	23	23

QUADRO 4– Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais por swab do moedor de carne de 23 estabelecimentos comerciais no município de Taquaritinga – S.P., no período de março de 2004 a janeiro de 2005.

NMP/g	Coliformes Totais	Coliformes Fecais
>1100	8	1
1100	4	0
460	1	1
240	2	1
150	1	1
93	1	0
75	1	0
43	1	0
28	0	1
15	1	0
9,2	0	1
7,4	0	1
7,2	1	1
3,6	0	4
< 3,0	2	11
TOTAL	23	23

QUADRO 5- Categorias de estabelecimentos com os respectivos isolamentos de *E. coli*, locais e STEC identificadas.

Estabelecimento	Atividade	Apresentação da carne no momento da coleta		Quantidade de cepas de <i>E. coli</i> isoladas			Cepas STEC
		Moída a pedido	Já moída (bandeja)	Carne moída	Mão do manipulador	Moedor de carne	
1	Açougue		X	3	-	-	-
2	Supermercado	X		1	-	-	-
3	Supermercado		X	-	-	1	-
4	Açougue		X	-	-	-	-
5	Açougue	X		-	-	-	-
6	Açougue		X	-	-	-	-
7	Mercearia		X	-	-	-	-
8	Mercearia		X	-	-	-	-
9	Mercearia		X	-	-	-	-
10	Supermercado	X		1	-	-	-
11	Supermercado		X	-	-	-	-
12	Açougue	X		-	-	-	-
13	Açougue	X		-	10	-	-
14	Açougue		X	9	25	21	1 carne moída 1 moedor de carne
15	Açougue		X	13	-	19	1 moedor de carne
16	Supermercado		X	9	-	2	-
17	Supermercado		X	5	7	33	-
18	Açougue	X		1	-	-	-
19	Mercearia	X		-	-	28	-
20	Supermercado	X		2	-	18	-
21	Supermercado	X		7	-	10	1 carne moída
22	Mercearia		X	-	-	-	-
23	Mercearia		X	40	-	22	-
TOTAL		09	14	91	42	154	4