

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

“PREVALÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *ESCHERICHIA COLI* O157, *SALMONELLA* SPP. E MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM BOVINOS ABATIDOS EM ESTABELECIMENTO DE EXPORTAÇÃO.”

André Vicente Ruiz de Matos

**BOTUCATU - SP
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

“PREVALÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *ESCHERICHIA COLI* O157, *SALMONELLA* SPP. E MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM BOVINOS ABATIDOS EM ESTABELECIMENTO DE EXPORTAÇÃO.”

André Vicente Ruiz de Matos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Área da concentração: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar).

Orientador: Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

**BOTUCATU - SP
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Matos, André Vicente Ruiz de.

Prevalência de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores de contaminação em bovinos abatidos em estabelecimento de exportação / André Vicente Ruiz de Matos. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Capes: 50505009

1. Bovino de corte. 2. Carne – Inspeção. 3. *Escherichia coli*. 4. Salmonela.

Palavras-chave: Bovinos; E. coli; Listeria; Micro-organismos indicadores; Qualidade do abate; *Salmonella*.

André Vicente Ruiz de Matos

**“Prevalência de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp. e
Micro-organismos Indicadores de contaminação em bovinos abatidos em
estabelecimento de exportação.”**

Comissão Julgadora da Dissertação
para obtenção do grau de Mestre

José Paes de Almeida Nogueira Pinto
(Orientador)

Jean Guilherme Fernandes Joaquim

Luciano dos Santos Bersot

Botucatu, 31 de janeiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Residentes, funcionários, estagiários e docentes do SOAP (Serviço de Orientação à Alimentação Pública) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHSVSP).

Agradeço ao docente Hélio Langoni por me apresentar à Pesquisa Científica, mas principalmente por acreditar e apostar em um aluno com reprovação e, além disso, conseguir uma bolsa FAPESP contrariando todas as tendências e expectativas.

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudo

Agradeço ao querido amigo e orientador José Paes de Almeida Nogueira Pinto pela atenção, paciência e principalmente pelo carinho com que me acolheu em sua casa, família e amigos.

Dedico esta obra para:

Maria Bárbara e Franciscos (uma alma iluminada);

*Aos meus amados pais Osvaldo e Marina que sempre me apoiaram e
proporcionaram tudo de melhor durante toda minha vida;*

Ao meu querido irmão Rodrigo Mauro e minha cunhada Roberta;

Aos meus padrinhos tia Lenir e tio Toninho;

*E a minha querida e amada companheira Myrna, que vivenciou de perto
todos os reveses e sucessos deste desafio, sempre compartilhando comigo as
diversas emoções e decisões;*

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Características bioquímicas das espécies do gênero <i>Listeria</i>	38
Tabela 2 - Medidas resumo-numéricas das Contagens dos micro-organismos indicadores.	49
Tabela 3 - Média Geométrica das contagens de Mesófilos (UFC/cm ²) nos diferentes pontos de coleta e seus respectivos intervalos de confiança (IC) 95%.	51
Tabela 4 - Média Geométrica das contagens de Coliformes Totais (UFC/cm ²) nos diferentes pontos de coleta e seus respectivos intervalos de confiança (IC) 95%.	54
Tabela 5 - Média Geométrica das contagens de <i>Escherichia coli</i> (UFC/cm ²) nos diferentes pontos de coleta e seus respectivos intervalos de confiança (IC) 95%.	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do abate de bovinos com indicação dos locais de coleta.	29
Figura 2 - Exemplo de amostragem no Ponto A	30
Figura 3 - Exemplo de amostragem no Ponto B	30
Figura 4 - Exemplo de amostragem no Ponto C	30
Figura 5 - Representação das carcaças bovinas antes (pontos A e B) e após (ponto C) a divisão em duas meias carcaças.	32
Figura 6 - Adição de 200ml de Solução Salina peptonada	32
Figura 7 - Homogenizador peristáltico Stomacher®	33
Figura 8 - Transferência dos homogenatos para tubos “falcon” de 50ml.	33
Figura 9 - Centrífuga refrigerada Eppendorf® 5410 R	33
Figura 10 - Adição de 100ml de Caldo Half Fraser	34
Figura 11 - Semeadura das diluições em Ágar Palcam	35
Figura 12 - Placa TSA-YE com colônias características para <i>Listeria</i> sp.	35
Figura 13 - Adição do Suplemento Half Fraser	36
Figura 14 - Caldo Fraser Suplementado e seus resultados	36
Figura 15 - Sequência de isolamento para <i>Listeria</i> sp.	37
Figura 16 - Aparelho de Imunoseparação Magnética	39
Figura 17 - Aspecto das beads depositadas na parede do tubo pela ação magnética.	40
Figura 18 – Meio de cultura Sorbitol MacConkey com suplemento Cefexime-Telurito e Meio Chromagar O157	40
Figura 19 – Caldos RVs e MKTTn	41
Figura 20 - Inoculação dos caldos em XLD e MLCB	42
Figura 21 - LIA e TSI	42
Figura 22 - Kit API-20E	42
Figura 23 - Sorologia	42
Figura 24 - Inoculação das diluições nos Petrifilms®	43
Figura 25 - Aspecto das colônias nos diferentes meios	44
Figura 26 - Representação da distribuição das médias (erro padrão) das contagens de Mesófilos (log-10 ufc/mL) nos diferentes pontos de coleta.	51

Figura 27 - Representação da distribuição das contagens de Mesófilos nos diferentes pontos de coleta (em escala logarítmica) com destaque para os diferentes quartis (25%).	52
Figura 28 - Representação da distribuição das médias (erro padrão) das contagens de Coliformes Totais (log-10 ufc/mL) nos diferentes pontos de coleta.	54
Figura 29 - Representação da distribuição das contagens de Coliformes Totais nos diferentes pontos de coleta (em escala logarítmica) com destaque para os diferentes quartis (25%).	55
Figura 30 - Representação da distribuição das médias (erro padrão) das contagens de <i>Escherichia coli</i> (log-10 ufc/mL) nos diferentes pontos de coleta.	57
Figura 31 - Representação da distribuição das contagens de <i>Escherichia coli</i> nos diferentes pontos de coleta (em escala logarítmica) com destaque para os diferentes quartis (25%).	58

SUMARIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
1.0 – INTRODUÇÃO	10
2.0 – REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 – <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.2 – <i>Escherichia coli</i>	18
2.3 – <i>Salmonella</i>	21
2.4 – Micro-organismos Indicadores	24
3.0 – JUSTIFICATIVA	27
4.0 – MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 – Coleta e Preparação das amostras	28
4.2 – Pesquisa e Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>	34
4.3 – Detecção de <i>Escherichia coli</i> O157.....	38
4.4 – Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	40
4.5 – Enumeração dos Micro-organismos Indicadores de Higiene.....	43
5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 – <i>Listeria monocytogenes</i>	45
5.2 – <i>Escherichia coli</i> O157.....	46
5.3 – <i>Salmonella</i> spp.....	47
5.4 – Micro-organismos Indicadores de Higiene	49
5.4.1 – Aeróbios Mesófilos.....	50
5.4.2 – Coliformes Totais.....	53
5.4.3 – <i>Escherichia coli</i>	56
5.4.4 – Considerações sobre as contagens.....	59
6.0 – CONCLUSÕES	60
7.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RESUMO

O tecido muscular de animais sadios é considerado estéril, livre de contaminação por qualquer micro-organismo. Após o abate, a carne passa a apresentar uma microbiota bastante variável, e sujeita a contaminações. Muitos desses micro-organismos são constituintes naturais da microbiota intestinal de bovinos, e procedimentos não adequados na linha de abate podem determinar rupturas de alças intestinais e contaminação das carcaças. Foram colhidas amostras de 100 carcaças em um frigorífico exportador, localizado no interior do Estado de São Paulo, amostradas ao longo de um ano através do método de esponjas, aplicado na região do peito do animal. As amostras foram colhidas em três pontos, denominados A, B e C, sendo cada carcaça amostrada nos três pontos, localizados nas etapas: pós sangria (A); pós esfolagem (B) e pós lavagem (C). Foram realizadas pesquisas de *Listeria* sp., *E. coli* O157, *Salmonella* spp. e Micro-organismos Indicadores (Petrifilms® AC, EC e EB). Não foram isolados *Listeria* ou *E. coli* O157 em nenhuma das 300 amostras. *Salmonella* spp. foi isolada em 9, sendo oito no ponto A e uma no ponto B. Para Mesófilos, as contagens variaram de 0 a 6,8 log UFC/cm², para Coliformes totais, de 0 a 4,57 log UFC/cm² e para *E. coli* de 0 a 4,38 log UFC/cm². Diante dos resultados obtidos, e em comparação com a literatura, conclui-se que o estabelecimento estudado apresenta qualidade, tanto sanitária (devido às baixas prevalências dos patógenos) quanto higiênica (devido à acentuada diminuição da carga microbiana de indicadores ao longo da linha).

ABSTRACT

The muscle tissue of healthy animals is considered sterile, free of any contamination by micro-organism. After slaughter, the meat begins to show a microbiota quite variable and subject to contamination. Many of these micro-organisms are natural constituents of the intestinal tract of cattle, and procedures not appropriate on the slaughter line may determine rupture of the bowel and contamination of carcasses. Samples were collected from 100 carcasses in a slaughterhouse exporter, located within the State of São Paulo, sampled over a year by the sponge method, applied to the chest of the animal. Samples were taken at three points, called A, B and C, each carcass sampled at three points located in steps: after bleeding (A) after skinning (B) and after washing (C). Research was conducted of *Listeria* sp., *E. coli* O157, *Salmonella* spp. and Micro-organism (Petrifilms[®] AC, EC and EB). Does not were isolated *Listeria* or *E. coli* O157 in any of the 300 samples. *Salmonella* spp. was isolated in nine, eight at point A and one at point B. To Mesophiles, scores ranged from 0 to 6.8 log UFC/cm²; for Total coliforms, 0 to 4.57 log UFC/cm² and *E. coli* from 0 to 4.38 log UFC/cm². With the results obtained and compared with the literaturer, it is concluded that the establishment in study has both quality sanitary (due to the low prevalence of pathogens) as hygienic quality (due to the sharp decrease in the microbial load of indicators along the line).

1.0 - INTRODUÇÃO

Os avanços técnico-científicos observados nas últimas duas décadas contribuíram para o aumento dos índices de produtividade dos animais, sendo o bovino uma espécie em destaque na produção de alimentos destinados ao consumo humano (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1996).

Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação) a produção de alimentos terá de aumentar em 70% até 2050 para suprir a expansão da população mundial (FAO, 2012).

A população mundial passou dos 7 bilhões de pessoas segundo o Fundo de População das Nações Unidas (UNFPA, 2011). Destes, calcula-se que 2 bilhões sejam mal nutridos e 840 milhões passem fome. A menos que sejam tomadas medidas para corrigir e adequar os sistemas de produção e distribuição de alimentos, esse quadro tende a se agravar, já que se estima que a demanda por produtos de origem animal triplique ou até mesmo quadruplique nos próximos 30 anos (D'SILVA, 2000). Entretanto, esse cenário poderia ainda ser pior, se a produção de alimentos não houvesse aumentado nos últimos anos. Nos países em desenvolvimento, por exemplo, nas últimas duas décadas observou-se um aumento de 127% na produção de carne e 331% na de ovos. Mesmo assim, somente 22% da proteína da dieta são de origem animal, enquanto que nos países desenvolvidos esse valor é de 60% (FRESCO & STEINFELD, 1997 apud D'SILVA, 2000).

O volume, cerca de 9,2 milhões de toneladas, e a regularidade da produção a preços competitivos, face ao consumo internacional crescente, consolidou o Brasil como o maior exportador mundial de carne bovina. Hoje ele exporta para mais de 180 países e destina anualmente 117.121 toneladas para a União Européia. Esta posição foi atingida com o aumento absoluto de 23,2% das exportações no período entre 2000 e 2006, através do aumento das encomendas dos compradores tradicionais e também da conquista de novos

mercados (ABIEC, 2010). O aumento da receita é explicado pelo aumento absoluto do preço da carne bovina no mercado internacional, além do aumento das vendas de cortes de maior valor, especialmente para a União Européia.

A fim de se verificar a qualidade e inocuidade final dos produtos, os sistemas de controle de qualidade utilizados na produção de carne bovina levam em consideração diferentes parâmetros microbiológicos, sendo os micro-organismos indicadores bastante utilizados para esse fim, como os aeróbios mesófilos e coliformes. A Comunidade Européia, por exemplo, determina a enumeração de aeróbios mesófilos e enterobactérias, além de pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças bovinas como medidas de verificação da qualidade microbiológica do processo de abate (COMMISSION REGULATION - EC, 2007). No caso do Brasil, os padrões geralmente são seguidos de acordo com as exigências de cada mercado importador, já que há somente um parâmetro microbiológico (*Salmonella* spp.) preconizado pela resolução do colegiado (RDC nº 12) para a carne bovina produzida e comercializada *in natura* no país (BRASIL, 2001).

A grande variação de mercados importadores impõe diferentes exigências e padrões de qualidade e higiene que devem ser preconizados. De forma geral, os cortes destinados ao mercado externo devem ser analisados quanto à presença de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, o que pode limitar a compra desses produtos caso não sejam atingidos os critérios microbiológicos estabelecidos pelos países importadores, como os membros da Comunidade Européia (COMMISSION REGULATION - EC, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 75% das doenças que têm afetado o homem nos últimos 10 anos são causadas por patógenos presentes em animais ou em produtos de origem animal. Muitas dessas doenças tornam-se um problema global devido ao seu alto potencial de disseminação (WHO, 2010).

Segundo a Food Agriculture Organization (FAO), um quinto da população mundial alimenta-se de carne. Por esta razão, atualmente, tem-se uma grande preocupação em

proporcionar às pessoas um produto mais saudável, uma vez que existem problemas sanitários ligados a este, sendo eles relacionados à contaminação, manipulação ou conservação inadequada (PIGATTO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008).

Para obtenção de um alimento seguro, os cuidados devem ter início na fase primária de produção. O sistema de “Boas Práticas Agrícolas” (BPA) apresenta-se como alternativa a ser empregada já na produção primária. Em alguns países há uma mentalidade voltada para sua adaptação e implantação nas fazendas através de programas do tipo “from farm to fork”, que numa tradução livre seria a produção de alimentos seguros envolvendo todas as etapas de produção, isto é, “da fazenda ao garfo do consumidor” (CULLOR, 1995; JOHNSTON, 2000).

O tecido muscular de animais sadios é considerado, em situações normais, estéril, livre de contaminação por qualquer micro-organismo. Após o abate e em decorrência de várias operações envolvidas na obtenção final das carcaças e cortes, a carne passa a apresentar uma microbiota bastante variável, uma vez que pode se tornar sujeita a contaminações provenientes de diferentes fontes. A contaminação microbiológica das carcaças bovinas ocorre principalmente durante o processamento e manipulação, nas etapas de esfolagem, evisceração, processamento de cortes, embalagem, estocagem e distribuição dentro de um frigorífico e para pontos comerciais (GILL, 1998). Fezes são consideradas como as principais fontes de contaminação e podem atingir a carcaça por deposição direta, e até mesmo por contato indireto com carcaças contaminadas, equipamentos, trabalhadores, instalações e ar (BORCH & ARINDER, 2002).

As primeiras incisões na pele, bem como parte da esfolagem é realizada com faca que pode ser contaminada pela superfície da carcaça. Facas esterilizadas usadas para incisão e separação da pele podem adquirir, em toda lâmina, aeróbios mesófilos, esporos de *Bacillus*, micro-organismos psicrófilos e gêneros pertencentes à família Enterobacteriaceae. Também é possível serem detectados diversos sorotipos do gênero *Salmonella*. Outras contaminações

nesta fase do trabalho são provenientes do contato da superfície da carcaça com a pele já separada ou mãos dos operários (ROÇA, 2004).

Diante do cenário descrito, este trabalho se justifica, pois pode revelar de forma dinâmica as condições higiênico-sanitárias ao longo de uma linha de abate de bovinos, por meio da identificação e enumeração de patógenos e micro-organismos indicadores. Estes dados atuam como parâmetros e ferramentas, que vão subsidiar um conjunto de práticas e ações que visam à manutenção da condição brasileira frente ao mercado internacional, com expectativa de aumento da produção de forma segura e responsável.

2.0 – REVISÃO

2.1 – *Listeria monocytogenes*

Apresentam-se na forma de bastonete gram positivo, móvel a 25°C, mas imóvel a 37°C, não formador de esporo, anaeróbio facultativo. O gênero *Listeria* é formado por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*.

Listeria monocytogenes é o agente causador da listeriose, doença zoonótica grave que pode levar ao aborto, problemas neurológicos, septicemia e disfunções gastrointestinais. Alguns estudos sugerem que até 21% dos humanos sejam portadores desta bactéria nos intestinos (SKIDMORE, 1981; SCHUCHAT et al., 1991; MASCOLA et al., 1992; SLUTSKER & SCHUCHAT, 1999). Este patógeno tem sido encontrado mundialmente em pelo menos 42 espécies de mamíferos, tanto domésticos quanto silvestres, assim como em pelo menos 22 espécies de pássaros e também em algumas espécies de peixes e moluscos (ANON., 1991;

RYSER & MARTH, 1999; ROCOURT et al., 2000; DESTRO, 2000). *L. monocytogenes* é um micro-organismo ubíquo, podendo ser isolado do solo, água, silagem, plantas e outras fontes ambientais. Esta bactéria é bem resistente e suporta os efeitos deletérios do congelamento, secagem, acidez e calor, mesmo não sendo formadora de esporos (CLIVER, 1990; PERRY & DONNELLY, 1990; PELL, 1997; RYSER & MARTH, 1999; DYKES & MOORHEAD, 2000).

Uma característica importante de *L. monocytogenes* é sua habilidade em sobreviver e se multiplicar dentro da célula eucariótica bem como induzir a infecção célula-célula. Os genes responsáveis pelo ciclo intracelular estão localizados no cromossomo, entre o locus *prs* e *ldh* o qual é referido como LIPI-1 ("*Listeria* pathogenicity island 1") (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Após a lise dos vacúolos, a qual é mediada por duas proteínas, listeriosina toxina formadora de poros (LLO) e fosfatidilinositol fosfolipase (PlcA), a replicação bacteriana é realizada no citosol.

Outros fatores também são descritos como importantes para os mecanismos de patogenicidade de *L. monocytogenes*. A proteína de superfície ActA conduz o micro-organismo para as fibras de actina e finalmente a conexão com a outra célula hospedeira é mediada pelas internalinas (CABANES et al., 2002). Dentro da família das internalinas já foram identificadas em *L. monocytogenes* a proteína InIA, a qual possui função de invasão através da interação com receptores de caderina em células epiteliais (LECUIT et al., 2001). Werbrouck et al. (2006) mostraram que diferenças no nível de expressão de InIA e InIB em isolados clínicos de *L. monocytogenes* interferem no mecanismo de invasão de linhagem hepáticas e entéricas. Quatro outras internalinas "like" (InIE, InIF, InIG e InIH) também são descritas no genoma bacteriano e estas possuem domínios de regiões ricas em leucina (LRR) e também regiões conservadas repetidas internas (IR). Domínios LRR são conhecidos por serem envolvidos em interação proteína-proteína, adesão, interação com receptores e sinalização (CABANES et al., 2002).

L. monocytogenes tem sido associada com alimentos tais como leite cru, leite supostamente pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, embutidos de carne, frango cru e

cozido, carne crua e peixes crus ou defumados. Sua habilidade de se desenvolver em temperaturas tão baixas quanto 3°C, permite sua multiplicação em alimentos refrigerados (RORVIK & YNDESTAD, 1991; SANAA et al., 1993; NORRUNG et al., 1999; PETERSEN & MADSEN, 2000; DESTRO, 2000; BERSOT et al., 2008).

L. monocytogenes é responsável por cerca de 2.500 casos de enfermidades transmitidas por alimentos por ano nos Estados Unidos, sendo 500 destes fatais. Já pelos dados do FoodNet (CDC-EUA), estima-se que ocorram 2493 casos de listeriose de origem alimentar anualmente, com 499 mortes, o que torna *L. monocytogenes* um dos 5 patógenos que mais causa morte nos EUA, sendo responsável por 28% do total de óbitos causados por doenças de origem alimentar naquele país (MEAD et al., 1999).

Com relação à listeriose causada por ingestão de produtos cárneos contaminados, o primeiro surto comprovado envolveu um tipo de patê importado pelo Reino Unido com 366 doentes e 63 mortes (McLAUCHLIN et al., 1991), e o primeiro relato nos Estados Unidos foi de um caso esporádico relacionado ao consumo de embutido de carne de peru, por um paciente com câncer (MMWR, 1989).

Uma grande variedade de carnes e produtos cárneos, além de plantas de processamento, têm sido associadas à contaminação por *L. monocytogenes* (NESBAKKEN et al., 1996; NORRUNG et al., 1999; CORDANO & ROCOURT, 2001; PECCIO et al., 2003; BARBALHO et al., 2005; GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004; BARROS et al., 2007).

Outro ponto crítico a ser analisado é a silagem, pois quando de baixa qualidade, pode favorecer enormemente a proliferação de *Listeria*. Há evidências de que a silagem fornecida aos animais possa ser veiculadora de *L. monocytogenes* (PERRY & DONNELLY, 1990). Quando animais que antes se alimentavam de pastagens começaram a ingerir silagem, observou-se um aumento na probabilidade destes excretarem *L. monocytogenes* nas fezes (FENLON et al., 1996). Há relatos de que a silagem é a fonte dessa contaminação na fazenda (KALAC, 1982; DICKSON & MACNEIL, 1991). Animais alimentados com silagem contaminada podem ser

portadores assintomáticos e disseminá-la no rebanho, assim como no leite (PERRY & DONNELLY, 1990; MANZANO et al., 1998; BOVILL et al., 2000). Em Vermont, EUA, Perry & Donnelly (1990) detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 2,9% de amostras de silagem. Na Escócia, Fenlon (1985) encontrou 2,5% das amostras examinadas de silagem em 1983, e 5,9% das amostras em 1984 contaminadas por *L. monocytogenes*.

O confinamento dos animais pode favorecer a disseminação de *Listeria* spp. e de outros micro-organismos patogênicos no rebanho. Num estudo realizado em Nebraska, EUA, com bovinos confinados, detectou-se uma média de 22% de animais com fezes contaminadas com *Listeria* spp., sendo 2,2% positivos para *L. monocytogenes*, estando os animais clinicamente saudáveis (SIRAGUSA et al., 1993). Outro levantamento da presença de *Listeria monocytogenes* em fezes de gado bovino abatido na Iugoslávia mostrou que 24% das amostras foram positivas para esta bactéria. Neste mesmo trabalho, a incidência de *L. monocytogenes* em carne moída foi de 69% (BUNCIC, 1991). Norrung et al. (1999) verificaram, na Dinamarca, uma taxa de 12,3% de *L. monocytogenes* em carne crua e 23,5% em carne processada. Um grande levantamento sobre a presença de micro-organismos patogênicos em carcaças de bovinos abatidos nos EUA foi realizado entre dezembro de 1993 e novembro de 1994 pelo Serviço de Inspeção Federal do país. Verificou-se que 238 (11,3%) das 2112 carcaças analisadas apresentaram *L. monocytogenes* como contaminante (ANON., 1996).

A eliminação de *L. monocytogenes* em ambientes de indústrias de alimentos é uma grande preocupação, já que é sabidamente conhecida a sua resistência a agentes antimicrobianos e substâncias químicas, como ácidos e álcalis. Entretanto, é a sua capacidade de adesão e consequente formação de biofilmes que atuam como principais fatores de persistência de *L. monocytogenes* em indústrias de alimentos (HOOD & ZOTTOLA, 1995; DYKES & MOORHEAD, 2001; DYKES, 2003; TAKHISTOV & GEORGE, 2004; MØRETRØ & LANGSRUD, 2004). Este micro-organismo possui comprovada capacidade de adesão em superfícies de diferentes tipos de materiais, tais como borracha, plástico, vidro e aço inoxidável,

frequentemente utilizados em utensílios e equipamentos em indústrias (BERESFORD et al., 2001; GANDHI & CHIKINDAS, 2007).

2.2 – *Escherichia coli*

Dentre os tipos de *E. coli* patogênicas, as cepas verotoxigênicas (VTEC) possuem grande importância epidemiológica, já que grande quantidade dos sorogrupos são comensais em bovinos e causam severa enfermidade em seres humanos, particularmente creditada ao sorogrupo O157, associado ou não ao sorogrupo H7 (SYNGE, 2000). Porém, vários outros sorogrupos são sabidamente produtores potenciais de verotoxinas, e estão associados a infecções esporádicas e surtos em humanos (COIA, 1998).

E. coli é uma espécie de bactéria pertencente à microbiota autóctone do trato entérico de mamíferos e aves. Entretanto, algumas cepas possuem potencial patogênico e causam distintas síndromes diarréicas, sendo divididas em diferentes grupos considerando seus fatores de virulência, síndromes clínicas, epidemiologia e diferentes sorogrupos (JAY et al., 2005).

A primeira descrição de que as cepas de *E. coli* poderiam produzir toxinas, que afetavam de forma irreversível as culturas de células Vero (células do rim de macacos-verdes), ocorreu em 1977 e em virtude dessa ação as toxinas foram denominadas verotoxinas (KONOWALCHUK et al., 1977). São também chamadas de toxinas de Shiga, devido a homologia na sequência de aminoácidos, estrutura e atividade com a toxina produzida por *Shigella dysenteriae* sorotipo 1 (CEBULA et al., 1995).

As toxinas de Shiga (stx) são fatores de virulência essenciais na patogênese de VTEC. Dois tipos de stx são conhecidas: stx1 e stx2 (STROCKBINE et al., 1986). A stx1 é uma molécula

altamente conservada e estruturalmente similar a toxina Shiga da *Shigella dysenteriae* tipo 1 (MELTON-CELSA et al., 1998). Porém, a stx2 possui variantes antigênicas (stx2c, stx2d, stx2e e stx2f) com diferentes funções biológicas (GYLES, 2006). Embora as stx1 e stx2 possuam mecanismos de ação parecidos, existem somente 55% de similaridade na sequência de aminoácidos entre as subunidades A. A subunidade B é responsável pela ligação à receptores do tipo globotriaosylceramida (Gb3) presentes na superfície celular. A presença desta classe de receptores é um determinante primário para susceptibilidade do tecido entérico à injúria. Existem evidências que citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β e tumor necrose fator- α) e butirato de sódio podem super-regular a expressão de Gb3 e aumentar a susceptibilidade da célula à infecção (GYLES, 2006). Após a adsorção, a penetração celular é mediada pela via dependente de clatrina, a qual direciona a molécula a vesículas endocíticas que a transporta até o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático e posteriormente ao citosol. Nesta etapa, a subunidade A dissociada promove a clivagem de adeninas complexadas ao RNA ribossômico 28S, e conseqüentemente impede a síntese proteica. Como resultado deste estresse ribotóxico a célula afetada ativa as suas vias de apoptose (SMITH et al., 2003).

A intimina é outro importante fator de virulência codificado pelo gene *eae* essencial para adesão da VTEC aos enterócitos (KAPER et al., 1998). Este gene já foi detectado em diversos sorotipos das VTEC e, em modelos animais está envolvido nos mecanismos de colonização (DONNEMBERG et al., 1991). Cinco tipos de intiminas já foram identificadas e designadas como α , β , γ , δ e ϵ . Estudos sugerem que os diferentes tipos de intiminas determinam o padrão de colonização e tropismo tecidual às placas de Peyer (ADU-BOBIE et al., 1998).

As enterohemolisinas são também reconhecidas como fatores de virulência das VTEC, sendo assim classificadas por causar hemólise em eritrócitos de ovinos. São sintetizadas como pro-toxinas que requerem processamento específico para a sua ativação e formação de poros na membrana dos eritrócitos (COOKSON et al., 2007). A presença desta classe de toxina é

frequentemente encontrada nos sorotipos O157:H7 e O111:H⁻ (SCHIMIDT et al., 1995; SCHIMIDT et al., 1996). Relacionada à síndrome urêmica hemorrágica, amostras de soro de pacientes comumente possuem anticorpos direcionados às hemolisinas das cepas da O157:H7 (SCHIMIDT et al., 1995).

Os bovinos são considerados os principais veiculadores de VTEC, uma vez que os animais infectados raramente apresentam sintomas evidentes e eliminam os micro-organismos continuamente pelas fezes, contaminando o ambiente e os alimentos produzidos (PHILLIPS, 1999). A transmissão de VTEC para seres humanos pode ocorrer de diferentes formas, como por contato direto com bovinos que estão eliminando esses micro-organismos, ou por consumo de alimentos e água contaminados. Essa última forma é a mais comum de transmissão, e é a frequentemente descrita em casos e surtos de infecções por VTEC (SYNGE, 2000). Os alimentos mais associados à transmissão de VTEC são carne bovina malpassada, leite cru, queijos feitos com leite cru, vegetais crus (contaminação cruzada) e produtos cárneos fermentados (BLACKBURN & MCCARTHY, 2000).

Os sintomas em seres humanos decorrentes da infecção por VTEC variam de quadros de diarreia com ou sem presença de sangue (colite hemorrágica), até a síndrome hemolítica urêmica, considerado o quadro mais grave. No Reino Unido, por exemplo, estima-se que 10% dos pacientes com colite hemorrágica desenvolvem a síndrome urêmica, com maior frequência de ocorrência entre pacientes com 0 a 4 anos e acima de 65 anos de idade, principalmente no verão (SIMMONS, 1997).

Vários trabalhos relatam a presença de VTEC em produtos cárneos. Carney et al. (2006) observaram uma frequência de 2,4% de VETC em cortes bovinos na Irlanda, com a maioria dos isolados apresentando importantes genes associados à patogenicidade. Chapman et al. (2001) verificaram a presença de *E. coli* O157 em um estudo desenvolvido ao longo de um ano na Inglaterra, e isolaram o patógeno em 12,9% dos bovinos, 1,4% das carcaças e em 0,44% dos produtos cárneos, com maiores frequências e contagens acima de 10^4 UFC/g entre os meses

de julho e agosto. Madden et al. (2001), em estudo realizado na Irlanda do Norte, não isolaram *E. coli* O157:H7 em nenhuma das carcaças bovinas analisadas. Fantelli & Stephan (2001) detectaram a presença de cepas de *E. coli* que apresentavam os genes stx1 e stx2 em 2,3% de amostras de carne picada na Suíça, Tutenel et al. (2003) detectaram *E. coli* O157 em carcaças bovinas e em amostras de carne moída, apresentando vários genes associados à patogenicidade. Em estudo realizado no Brasil e na Argentina, a maioria dos isolados de *E. coli* verotoxingênicas apresentaram o gene stx2, com diferenças no potencial patogênico considerando os sorotipos e genótipos (GUTH et al., 2003).

2.3 – Salmonella

O gênero *Salmonella* constitui-se de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos com flagelos peritríquios, com exceção de *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* (aflagelares) (SILVA, 1997).

O nome do gênero foi primeiramente sugerido por Lignières em 1900, em reconhecimento ao trabalho realizado pelo bacteriologista americano Daniel Elmer Salmon, que, juntamente com Theobald Smith, em 1886, descreveram o bacilo da "peste suína" (BELL & KYRIAKIDES 2002).

Em 1888, Gaertner isolou *Bacterium enteritidis* (posteriormente renomeado *Salmonella ENTERITIDIS*) tanto da carne de um bovino quanto dos órgãos de um homem que morreu 36 horas após a ingestão do alimento. Este homem foi uma das 58 pessoas que consumiram o produto e desenvolveram infecção alimentar. Este é provavelmente o primeiro surto de salmonelose confirmado em laboratório (TOPLEY & WILSON, 1929b).

A taxonomia é complexa e diferentes sistemas são empregados para definir esse gênero. Entretanto, a nomenclatura adotada por vários centros de referência internacional para

sorotipagem reconhece que o gênero *Salmonella* é taxonomicamente dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*, (BRENNER et al., 2000; POPOFF & LEMINOR, 2005). Recentemente, foi proposta a inclusão de uma terceira espécie denominada *S. subterranea*, isolada de sedimento coletado de uma região aquífera nos Estados Unidos (SHELOBOLINA et al., 2004).

A espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies, referidas por nomes e algarismos romanos: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II), *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécie *houtenae* (IV) e *S. enterica* subespécie *indica* (VI) (BRENNER et al., 2000; POPOFF & LE MINOR, 2005).

Cada espécie e/ou subespécies, apresenta diversos sorotipos já descritos, totalizando atualmente 2587 para *S. enterica* e suas subespécies, e 23 para *S. bongori* (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

A sorotipagem é baseada no esquema de Kauffmann-White e consiste na caracterização dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (POPOFF & LE MINOR, 1997).

Embora todos os sorotipos de *Salmonella* devam ser considerados patogênicos, apenas um número limitado deles é responsável por infecção em humanos e animais (FARMER III et al., 1984). A maioria dos sorotipos responsáveis pelas enfermidades pertence à espécie *enterica* subespécie *enterica* (POPOFF e LEMINOR, 2005).

As doenças causadas por *Salmonella* são divididas em três grupos: febre tifóide, que tem como agente etiológico o sorotipo *Salmonella* Typhi, febres entéricas, que têm como agentes etiológicos *Salmonella* Paratyphi A, B e C, e as enterocolites, que podem ser causadas, teoricamente, por todos os demais sorotipos (FRANCO & LANDGRAF, 1996; CONNOR & SCHWARTZ, 2005).

Os principais sintomas das salmoneloses clássicas (enterocolites) são dores abdominais, diarreia, vômito e febre e, em média, ocorrem de 12 a 36 horas após o consumo de água e

alimentos contaminados. Entretanto, esse período de incubação pode variar em função da quantidade de células viáveis ingeridas e do sorotipo envolvido (SALYERS & WHITT, 1994). A dose infectante, em pessoas saudáveis, também varia de acordo com o sorotipo e alimento envolvidos, podendo ser de poucas células (< 10, por exemplo) a milhares ou milhões delas (10^5 a 10^6 /g ou mL do alimento ou água) (VARNAN & EVANS, 1991; MORGAN et al., 1994; VOUGHT & TATINI, 1998).

As salmoneloses podem ser graves, especialmente em crianças, idosos e pessoas imunodeprimidas, uma vez que a bactéria pode atingir a corrente sanguínea e provocar infecções extra-intestinais (D'AOUST et al, 2001). O risco de doenças invasivas causadas por *Salmonella* pode ser de duas a seis vezes maior quando comparado com infecções ocasionadas por outros patógenos de origem alimentar, assim como é maior também a incidência de óbitos (ADAK et al., 2005; HELMS et al., 2006).

Os resultados obtidos em pesquisas, quanto à presença de *Salmonella* spp. em produtos cárneos são bastante variados. Souza e Joelle (2000), Salvatori et al. (2003) e Marques et al. (2006) não detectaram este patógeno em 30 amostras de carne bovina moída em Macapá, em 70 amostras de embutidos frescos (linguiça crua e derivados) provenientes de comércio varejista em Porto Alegre e em 40 amostras de linguiças adquiridas de estabelecimentos comerciais em Minas Gerais, respectivamente.

Por outro lado Reis et al. (1995) em Cuiabá - MT, Giombelli e Silva (2001) em Chapecó - SC e nos Estados Unidos Betancourt et al. (2004) isolaram este micro-organismo respectivamente em: 26% das amostras de produtos cárneos, em 50,50% de 95 amostras de carne *in natura* e 0,8% das carcaças de dois frigoríficos um no sul e outro no norte dos EUA.

Em estabelecimento frigorífico na Irlanda, McEvoy et al. (2003) identificaram presença de *Salmonella* em amostras de fezes, rúmens e carcaças, sendo que os sorotipos isolados foram *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Agona.

Em João Pessoa, Oliveira et al. (2008) não detectaram *Salmonella* nos estabelecimentos que comercializam carne bovina, tanto no ambiente como também nos produtos cárneos.

2.4 – Micro-organismos Indicadores

São considerados micro-organismos indicadores os grupos ou espécies de micro-organismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento. Além disso, podem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento do alimento (GOMBOSSY & LANDGRAF, 2003).

A inocuidade e a qualidade de produtos cárneos podem ser estimadas através da pesquisa de diversos micro-organismos indicadores, como os aeróbios mesófilos e coliformes. A enumeração de aeróbios mesófilos fornece uma estimativa da população geral de micro-organismos que estão presentes nos produtos cárneos, e altos níveis de contaminação estão associados à baixa qualidade (GILL, 1998; JAY et al., 2005). Coliformes, principalmente *Escherichia coli*, geralmente são associados à contaminação por matéria de origem fecal e sugerem a presença de patógenos de origem entérica (EISEL et al., 1997; JAY et al., 2005). Segundo a legislação americana, a pesquisa de *E. coli* em carcaças bovinas é obrigatória a fim de se controlar a contaminação por patógenos de origem entérica (USDA, 1996).

Os micro-organismos indicadores também estão relacionados com critérios microbiológicos, utilizados para avaliar a segurança do alimento, a adesão às Boas Práticas de Fabricação e a vida de prateleira do alimento. Com isto, proporcionam informações para a aceitabilidade ou rejeição de um produto (PIERSON & SMOOT, 2001).

Segundo a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1984), os indicadores podem ser agrupados em duas categorias: (I) Micro-organismos

que não oferecem um risco direto a saúde: contagem padrão de mesófilos, contagem de psicrótróficos e termófilos, contagem de bolores e leveduras. (II) Micro-organismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes totais, coliformes fecais, enterococos, enterobactérias totais e *Escherichia coli*.

Um microrganismo indicador deve apresentar as seguintes características: i) ser de fácil e rápida detecção na amostra; ii) ser facilmente diferenciado de outros membros da microbiota presente; iii) ser detectado na presença de patógenos e não detectado na ausência dos mesmos, com exceção de números mínimos; iv) possuir características e taxas de crescimento equivalentes às do patógeno (LIMA & SOUSA, 2002).

Níveis de contaminação por aeróbios mesófilos abaixo de 10^5 UFC/cm² indicam boas condições de higiene durante o abate. Contaminação de carnes em níveis acima de 10^6 UFC/cm² indica início de processo de deterioração, com produção de odores típicos e redução do “shelf-life”. Quando o nível de contaminação atinge valores da ordem de 10^7 UFC/cm² a formação de limosidade já é evidente (GILL, 1998).

Phillips et al. (2001) analisaram 1.275 amostras de carcaças bovinas em diferentes estabelecimentos australianos e encontraram valores médios de $2,6 \times 10^2$ UFC/cm² para contagem total de mesófilos nas carcaças após a refrigeração.

Collobert et al. (2002), analisando 233 carcaças bovinas na região de Calvados na França, isolaram mesófilos com populações médias de $6,0 \times 10^3$ UFC/cm².

Hansson (2001), após análise de 200 carcaças bovinas em frigoríficos de alta e baixa capacidade de abate na Suíça, encontrou valores médios de mesófilos de $3,8 \times 10^2$ UFC/cm² nas plantas de alta capacidade e $2,7 \times 10^3$ UFC/cm² nas de baixa capacidade; e para coliformes, em 50% das amostras das unidades de alta capacidade e 42% das de baixa capacidade. O valor mais elevado de coliformes nos abatedouros de alta capacidade foi de $3,7 \times 10^2$ bactérias/cm² e nos de baixa foi de $1,5 \times 10^4$ bactérias/cm². No teste para *E. coli*, nos abatedouros de alta

capacidade, sua presença foi detectada em 34% das amostras de carcaça bovina, com 41% das amostras dos abatedouros de baixa capacidade também a evidenciando.

Bell (1997) demonstrou que os locais das carcaças que tiveram contato direto com contaminação fecal, contida ou oriunda da pele, apresentaram contagens de micro-organismos aeróbios iguais ou superiores a 10^4 UFC/cm² e *E. coli* excedente a 10^2 UFC/cm².

Apesar de alguns micro-organismos indicadores sugerirem a presença de certos perigos microbiológicos, a pesquisa efetiva de patógenos é fundamental pra garantia da segurança microbiológica de produtos cárneos

3.0 – JUSTIFICATIVA

A contaminação da carne bovina pelos patógenos descritos e por micro-organismos indicadores de higiene pode ocorrer em diferentes etapas do abate e processamento de produtos cárneos. Como observado, muitos desses micro-organismos são constituintes naturais da microbiota intestinal de bovinos, e procedimentos não adequados na linha de abate podem determinar rupturas de alças intestinais e contaminação das carcaças. Outra característica importante que não pode ser descartada como foco de contaminação é a capacidade de *L. monocytogenes* e *Salmonella* de formarem biofilmes em utensílios e equipamentos em contato direto com produtos cárneos (HOOD & ZOTTOLA, 1997).

Considerando a importância que a carne bovina representa para a economia do Brasil, estudos que sejam desenvolvidos na cadeia de produção a fim de garantir qualidade e segurança microbiológica a esse produto são fundamentais. A obtenção de produtos cárneos com qualidade e segurança microbiológica garantirá a manutenção da posição do Brasil como maior exportador mundial de carne bovina, além de assegurar para a população um produto de alta qualidade e segurança.

Os dados obtidos neste estudo são parte integrante de dois projetos abrangentes que têm como objetivo levantar dados sobre a contaminação de cortes cárneos, utensílios e manipuladores com a finalidade de estabelecer um estudo futuro de Análise de Risco, intitulados: “Epidemiologia molecular de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* verotoxigênica na linha de abate e processamento de carne bovina” (Edital MCT/CNPq/CT - Agronegócio/MAPA - SDC No 40/2008) e “Implantação de um Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para Avaliação de Riscos Microbiológicos em Produtos de Origem Animal (CDA – ARMPOA)” (Edital CNPQ/MAPA/SDA Nº 64/2008).

4.0 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Coleta e Preparação das Amostras

Foram colhidas amostras de 100 carcaças em um frigorífico exportador de carne bovina, localizado no interior do Estado de São Paulo, amostradas aleatoriamente ao longo de um ano.

Para amostragem utilizou-se o método de esponjas, aplicado na região do peito do animal, seguindo normas internacionais (ANDREWS & HAMMACK, 1998). As esponjas estéreis apresentam-se embaladas individualmente, e foram previamente hidratadas com 10 ml de salina 0,9%, sempre no dia anterior às coletas.

As amostras foram colhidas em três pontos do processo de abate, denominados A, B e C, sendo cada carcaça amostrada nos três pontos, localizados na linha de abate nas etapas: pós sangria (A); pós esfolia (B) e pós lavagem (C) (Figuras 1, 2, 3, 4).

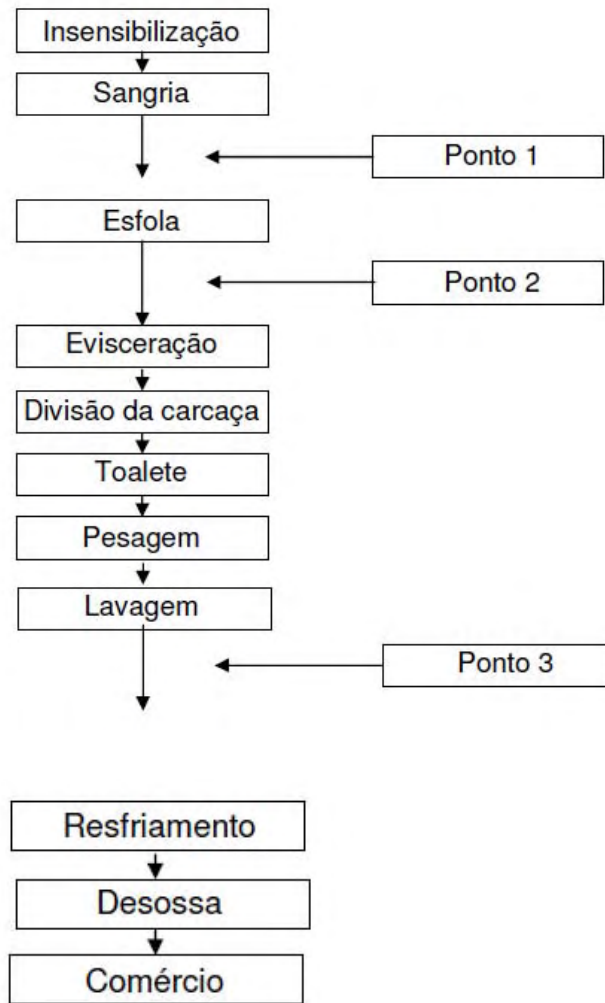


Figura 1. Representação esquemática do abate de bovinos com indicação dos locais de coleta.



Figura 2. Exemplo de amostragem no Ponto A



Figura 3. Exemplo de amostragem no Ponto B



Figura 4. Exemplo de amostragem no Ponto C

Em cada ponto foram amostradas quatro áreas de 100 cm², com auxílio de quatro esponjas que foram depositadas em uma única bolsa plástica estéril. As esponjas foram aplicadas na região do peito do animal em forma de esfregaço (técnica não destrutiva), perfazendo uma área total de 400cm², e de acordo com recomendações vigentes na Comunidade Européia (COMISSION REGULATION - EC, 2007). Antes da divisão em duas meias carcaças (pontos A e B), as quatro áreas amostradas foram localizadas apenas externamente, sendo duas do lado direito e duas do lado esquerdo da carcaça inteira. Após a divisão (ponto C), cada meia carcaça foi amostrada em duas áreas (uma interna e uma externa) (Figura5).

As quatro esponjas obtidas em cada ponto, para cada animal, foram acondicionadas em uma única bolsa plástica esterilizada (Nasco) (Adaptado de SILVA *et al.*, 2007). Em seguida, as amostras foram transferidas para caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e transportadas ao Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, câmpus de Botucatu, imediatamente após a colheita.



Figura 5. Esquema representativo de carcaças bovinas antes (pontos A e B) e após (ponto C) a divisão em duas meias carcaças, com indicação dos pontos (*) onde ocorreu a coleta de amostras superficiais em áreas de 100cm² (10cm x 10cm) (Fonte: Arquivo do autor, 2010).

No laboratório, foram adicionados 160 mL de solução salina peptonada a cada bolsa plástica, sendo a mistura homogeneizada em Stomacher® por 60 segundos (Figuras 6 e 7). De cada homogenato obtido, com o auxílio de pipetas estéreis, foram transferidas três alíquotas de 40 ml cada para tubos estéreis do tipo “falcon”, cada um deles com capacidade de 50 ml. Estes tubos foram submetidos à centrifugação por 1000G durante 15 minutos à temperatura de 4°C (Figuras 8 e 9).



Figura 6. Adição de 160ml de Solução Salina peptonada



Figura 7. Homogenizador peristáltico Stomacher®



Figura 8. Transferência dos homogenatos para tubos “falcon” de 50ml.



Figura 9. Centrífuga refrigerada Eppendorf® 5410 R

4.2 – Pesquisa e Enumeração de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa e a enumeração de *Listeria monocytogenes* foram realizadas conforme descrito nas ISO 11290-1 e 11290-2. Os sedimentos das alíquotas de 40 mL supra-citadas foram ressuspensos em Caldo Half Fraser, e incubados a 20 °C durante 1 hora (Figura 10).

Para a enumeração de *L. monocytogenes* uma alíquota de 1,0 mL do Caldo Half Fraser, após a incubação de 1 hora, foi transferida para um tubo contendo 9,0 mL de água peptonada tamponada (BPW), sendo realizadas diluições decimais seriadas que foram semeadas em superfície de placas de ágar Palcam (Figura 11). As placas foram incubadas a 37°C/ 48 horas. Após este período as colônias características foram contadas e 3 a 5 dessas colônias selecionadas foram semeadas em TSA adicionado de extrato de levedura (TSA-YE) e incubadas a 37°C/ 24 horas (Figura 12). As colônias típicas de *Listeria* spp. foram submetidas a identificação bioquímica descrita a seguir.



Figura 10. Adição de 100ml de Caldo Half Fraser



Figura 11. Semeadura das diluições em Ágar Palcam



Figura 12. Placa TSA-YE com colônias características para *Listeria* sp.

Após a incubação inicial e a retirada da alíquota para a enumeração, foi adicionado o suplemento do caldo Half Fraser (Figura 13), com incubação a 30°C/ 24 horas. Decorrido este período, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para tubo contendo 10 mL de caldo Fraser suplementado e incubado a 37°C/ 48 horas (Figura 14). A seguir realizou-se a semeadura em placas de ágar Palcam e ágar Oxford que foram incubadas a 37°C/ 48 horas. Entre 3 e 5 colônias características forma semeadas em TSAYE e incubadas a 37°C/ 24 horas. Após a verificação de sua pureza, os isolados foram submetidos às provas bioquímicas.



Figura 13. Adição do Suplemento Half Fraser

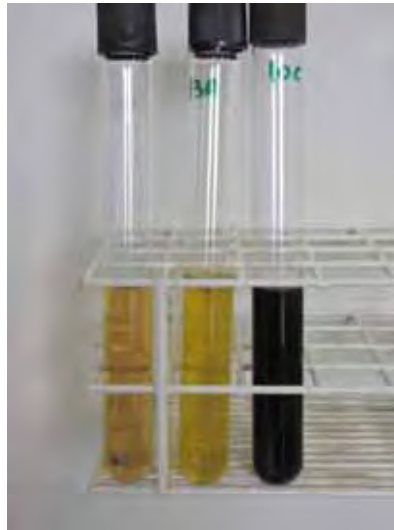


Figura 14. Caldo Fraser Suplementado, o primeiro tubo a partir da esquerda mostra o aspecto do caldo estéril, o segundo uma reação negativa, e o terceiro uma reação positiva (hidrólise da esculina).

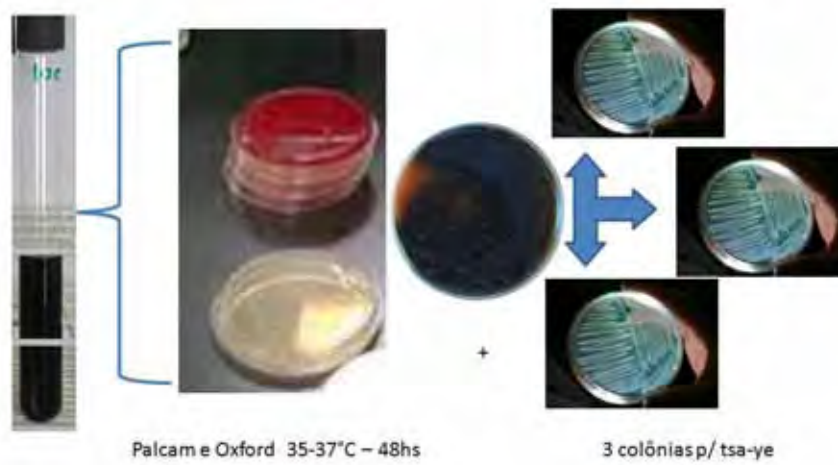


Figura 15. Sequência de isolamento para *Listeria* sp.

Para caracterização bioquímica, as colônias de cada placa de TSA-YE foram selecionadas e estocadas em tubos contendo TSA-YE. A partir dos tubos, foram realizados os testes bioquímicos de reação de catalase, fermentação de carboidratos, e teste de verificação de

hemólise e outros testes complementares como coloração de Gram e teste de motilidade, conforme Pagotto et al. (2006) e confirmação de isolados pelo API Listeria. Todas as provas foram realizadas na presença de um controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644), para descartar qualquer falha dos reagentes ou preparo dos meios de cultura. Considerando os resultados obtidos nos testes bioquímicos, as culturas obtidas foram identificadas conforme os resultados descritos a seguir.

Espécie	Carboidratos				β-Hemólise	
	Dextrose	Xilose	Ramnose	Manitol		
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+ ^b	
<i>L. innocua</i>	+	-	d ^a	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	-	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	-	-	+ ^c
<i>L. welshimeri</i>	+	+	d	-	-	-
<i>L. grayi</i>	+	-	-	+	-	-
<i>L. murrayi</i>	+	-	d	+	-	-

^a Símbolo padrão: +, ≥ 90% positivo; -, ≥90% negativo; d, 11-89% das cepas são positivas.

^b Nem todas as cepas de *L. monocytogenes* exibem β-hemólise - a cepa ATCC 15313 não é hemolítica em sangue de cavalo, carneiro e bovino.

^c Um halo fraco ou múltiplos halos de hemólise usualmente são exibidos pelas cepas de *L. ivanovii*.

Tabela 1. - Características bioquímicas das espécies do gênero *Listeria*.

Após confirmação da espécie (*L. monocytogenes*), os isolados foram submetidos a identificação sorológica com antisoros somáticos e flagelares, conforme descrito por Seelinger & Hohne (1979) e Garcia et al. (1990).

O resultado de cada análise de detecção foi expresso como ausência ou presença de *Listeria* sp./cm².

4.3 - Detecção de *Escherichia coli* O157

Para a pesquisa, as amostras coletadas foram submetidas às metodologias de detecção descritas pelo Food and Drug Administration no Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2010) e método ISO 16654, com modificações. A metodologia proposta emprega meios de

enriquecimento e isolamento adicionados de diversas substâncias antimicrobianas, que têm a função de inibir o desenvolvimento da microbiota acompanhante e possíveis interferências. Uma alíquota de 40 mL dos homogenatos obtidos foi centrifugada e o sedimento re-suspendido em 10 mL de caldo triptona soja modificada contendo novobiocina (mTSB + N), com incubação a 41,5°C por 6h e por 18-24h. A concentração e separação dos micro-organismos foram realizadas utilizando-se a técnica de separação imunomagnética (IMS), empregando-se partículas imunomagnéticas recobertas com anticorpos anti-O157 (Dynabeads® anti-E.coli O157 Cat. Nº 710.04 – Invitrogen do Brasil) (Figuras 16 e 17). Para isolamento foram utilizados o ágar MacConkey telurito cefixima sorbitol (TM-SMAC), o ágar de MacConkey Sorbitol e o CHROMagar O157 Ref. EE220 – Invitrogen do Brasil (Figura 18). Quando presentes, cinco colônias sorbitol negativas foram submetidas à confirmação para *E. coli* O157 por testes sorológicos.

O resultado de cada análise de detecção foi expresso como ausência ou presença de *E. coli/cm*².



Figura 16. Aparelho de Imunoseparação Magnética

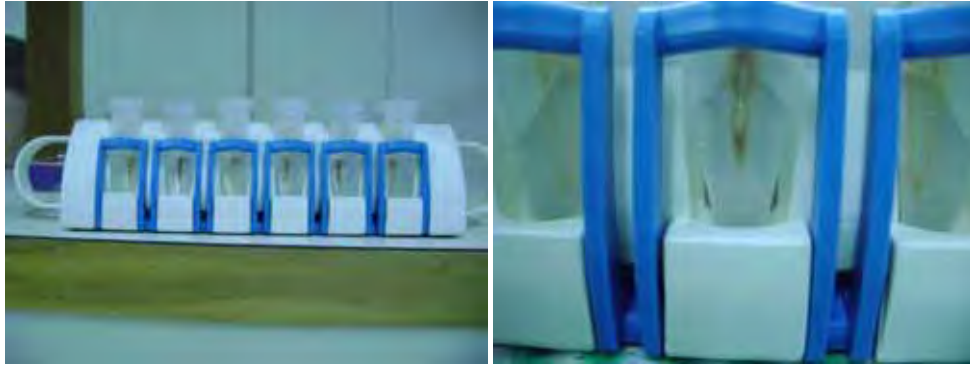


Figura 17. Aspecto das beads depositadas na parede do tubo pela ação magnética.



Figura 18. Meio de cultura Sorbitol MacConkey com suplemento Cefexime-Telurito e Meio Chromagar O157

4.4 – Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. foi utilizada a metodologia descrita pela *International Organization for Standardization* (ISO 6579:2002).

Cada alíquota de 40 mL do homogenato obtido foi centrifugada e o sedimento resuspenso em água peptonada tamponada (APT), e incubada a 37°C por 18h. Em seguida, transferiu-se 0,1mL da APT para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) e incubado a 41,5°C por 24h em banho maria. Outra alíquota de 1mL foi transferida para um tubo contendo 10mL de caldo Tetrionato Muller-Kauffmann com novobiocina (MKTTn) e incubado a 37°C por 24h (Figura 19). Após incubação, um inóculo de cada caldo foi transferido para placas com ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e ágar Manitol Lisina Cristal Violeta Verde Brilhante (MLCB), com incubação a 37°C por 18-24h (Figura 20). Duas a cinco colônias típicas de *Salmonella* spp. foram submetidas à provas bioquímicas, empregando-se ágar tríplice açúcar ferro (TSI), e ágar lisina Ferro (LIA), com incubação dos mesmos realizada a 35° C por 18-24h (Figura 21). Foram realizados ainda os seguintes testes bioquímicos: produção de indol, reação de Vermelho de Metila e de *Voges - Proskauer*, utilização de citrato, utilização de glicose e lactose, observação do movimento de produção de fenilalanina desaminase (kit API-20E bioMérieux®) (Figura 22). Nos isolados suspeitos de *Salmonella* spp. realizou-se então o teste de soro-aglutinação com emprego de anti-soro polivalente flagelar somático da Probac® (Figura 23).

O resultado de cada análise de detecção foi expresso como ausência ou presença de *Salmonella* spp./cm².



Figura 19. Caldos RVs e MKTTn



Figura 20. Inoculação dos caldos em XLD e MLCB



Figura 21. LIA e TSI



Figura 22. Kit API-20E



Figura 23. Sorologia

4.5 - Enumeração de Micro-organismos indicadores de higiene

Para a enumeração dos micro-organismos mesófilos aeróbios, coliforme totais e *Escherichia coli*, retirou-se uma alíquota de 1 mL das misturas nas bolsas plásticas, sendo a mesma transferida para um tubo com 9mL de solução salina 0,85% e submetida a diluições decimais seriadas em solução salina 0,85%. A partir de cada uma das diluições, transferiu-se 1 mL para placas de *Petrifilm EC*TM (3M do Brasil Ltda) para a enumeração de Coliformes Totais e *E. coli* e 1 mL para placas de *Petrifilm AC*TM (3M do Brasil Ltda) para a enumeração de Mesófilos Aeróbios, sendo ambas incubadas a 35-37°C por 24 e 48 horas (Figura 24). Para inoculação das placas, empregaram-se os difusores apropriados para cada tipo de placa.

Para a contagem de Mesófilos aeróbios foram consideradas as colônias de coloração vermelha, e para a contagem de *E.coli* foram consideradas as colônias azuis ou vermelho-azuladas associadas com bolhas de gás. O número de coliformes totais correspondeu à somatória das contagens das colônias azuis e das colônias vermelhas associadas com bolhas de gás presentes em cada placa (Figura 25).



Figura 24. Inoculação das diluições nos Petrifilms®

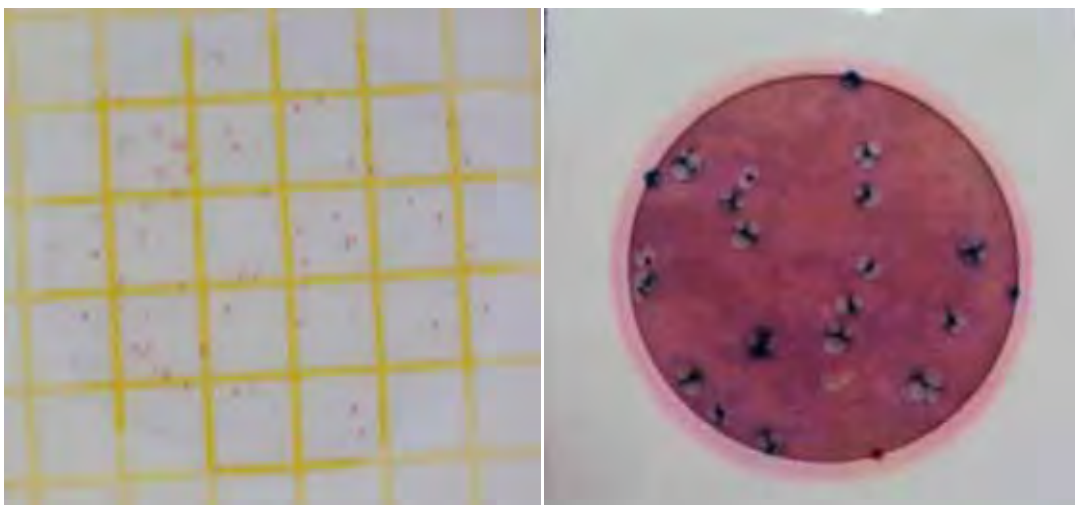


Figura 25. Aspecto das colônias nos diferentes meios

Considerando que as quatro esponjas foram aplicadas a uma superfície de 400cm^2 , e que cada mistura das quatro esponjas foi homogeneizada em 200 mL de solução salina peptonada, calculou-se que a alíquota de 1 mL transferida para as placas *Petrifilm* corresponde a uma área de amostragem de 2cm^2 . Os resultados das contagens foram inicialmente expressos em Unidades Formadoras de Colônias por cm^2 de carcaça (UFC/cm^2), posteriormente transformados para uma escala logarítmica de base 10. Para produzir estatísticas descritivas, a Média Geométrica foi usada com respectivos intervalos de confiança 95%. Modelos lineares mistos com medidas repetidas (PROC MIXED; SAS INSTITUTE, 2009) foram utilizados para avaliar a diferença da média de cada contagem de micro-organismos

indicadores entre os pontos de coleta (A, B e C). Uma estrutura de covariância auto-regressiva (LITTELL ET AL., 2006) foi usada para modelar a correlação entre as medidas repetidas dentro da mesma carcaça. O método de Tukey foi usado para ajustar os valores-P relativos à comparação de médias entre pontos de coleta. Significância estatística foi considerada para $P < 0.05$.

5.0 – Resultados e Discussão

5.1 – *Listeria monocitogenes*

Das 100 carcaças coletadas, obtivemos um total de 300 amostras (3 pontos por animal). Neste estudo, nenhuma das amostras mostrou resultado positivo para *Listeria* sp.

Em 2010, Oliveira et al. isolaram 1 amostra de *L. innocua* dentre 20 carcaças analisadas em um frigorífico da região sul do estado do Rio Grande do Sul. Neste trabalho, as condições de coleta e análise foram semelhantes às descritas em nosso experimento, e seus resultados corroboraram com os apresentados nesta dissertação; embora com amostragem reduzida, houve uma baixa prevalência de isolamento do micro-organismo (3,8%). Em 2003, Peccio et. al. isolaram, pela técnica do Número Mais Provável (NMP), *Listeria monocytogenes* de uma das 14 carcaças analisadas em um abatedouro no nordeste da Itália.

Por outro lado, em 2004 Gudbjörnsdóttir et al. isolaram o patógeno em 15,6% das amostras cárneas analisadas; Buncic, em 1991 na Iugoslávia, obteve 69% de isolados em carne moída; Norung et al., 12,3% em carne crua processada na Dinamarca em 1999; Barros et al., em 2007, obtiveram positividade em 27 das 151 carcaças analisadas (17,9%) no Paraná; Cordano, & Rocourt, em 2001 no Chile, isolaram o patógeno em 3,6% das 634 produtos cárneos analisados. Em 1996, 238 das 2112 carcaças analisadas pela Inspeção Federal Americana apresentavam *L. monocytogenes*.

Frente aos dados expostos, as carcaças amostradas neste experimento apresentaram excelente condição sanitária para *Listeria monocytogenes* devido à ausência deste patógeno.

5.2 – *Escherichia coli* O 157

Das 100 carcaças coletadas, obtivemos um total de 300 amostras (3 pontos por animal). Neste estudo, nenhuma das amostras obteve resultado positivo para esta linhagem patogênica, como também reportado por Madden et al. em 2001, com nenhum isolado das 200 carcaças analisadas na Irlanda do Norte. Entretanto, Carney et al. isolaram *E. coli* verotoxigênica em 2,4% dos cortes bovinos analisados na Irlanda em 2006.

Tutenel et al. (2003) isolaram *E coli* O157 em 25 das 2452 carcaças amostradas entre 1999 e 2001 na Bélgica. Já em 2001, Chapman et al. isolaram o patógeno em 1,4% das carcaças amostradas na Inglaterra ao longo de um ano. Dez anos após, em 2011, Rigobelo et al. isolaram 120 *E coli* produtoras de toxina de Shiga de 600 carcaças amostradas em abatedouros do Sudeste do Brasil.

Frente aos dados expostos, as carcaças amostradas neste experimento apresentaram excelente condição sanitária para *Escherichia coli* O 157 devido à ausência deste patógeno.

5.3 – *Salmonella* spp.

Das 100 carcaças coletadas, obtivemos um total de 300 amostras (3 pontos por animal). Foram detectadas nove amostras positivas para *Salmonella* sp., sendo oito no ponto A e uma no ponto B.

Bosilevac et al. (2009) pesquisaram em sete abatedouros de pequeno porte, nos Estados Unidos, a presença de *Salmonella* spp. em 1950 carcaças, obtendo 58% de positividade. Brichta-Harhayv et al. (2008), nos Estados Unidos, detectaram o patógeno em carcaças nas etapas de pré e pós-evisceração em porcentagens de 50,2% e 0,8%, respectivamente.

Vanderlinde et al. (1998), na Austrália, pesquisaram o patógeno em carcaças bovinas e encontraram 1,4% de positividade em frigoríficos que destinam seus produtos para o mercado interno e 0,27% em amostras colhidas em frigorífico de exportação.

Sofos et al., (1999) em estudo realizado em sete plantas de abate dos Estados Unidos isolaram 1,5% de amostras positivas para *Samonella* spp. em carcaças de bovinos. Keogh et al. (2001) avaliaram 250 bovinos em abatedouro Irlandês e detectaram 7,6% de positividade para o patógeno. Madden et al. (2001) pesquisaram, na Irlanda do Norte, a presença de *Samonella* spp. em 200 carcaças de bovinos, tendo detectado somente três carcaças positivas, resultado semelhante ao obtido por Collobert et al. (2002) que em um estabelecimento frigorífico, da região de Calvados na França, detectaram este mesmo patógeno em três das 233 carcaças bovinas avaliadas.

Em pesquisa realizada por Fontoura (2010), em estabelecimento frigorífico localizado no interior de São Paulo, *Salmonella* spp. não foi isolada em nenhuma das 40 carcaças avaliadas na etapa pós-lavagem.

Nouichi e Hamdi (2009), na Argélia, pesquisaram a presença de *Salmonella* em três áreas da carcaça bovina (alcatra, peito e ante-braço). Isolaram *Salmonella* em 7 (10%) das carcaças bovinas, sendo o ante-braço (58,33%) e o peito (33,33%) as mais contaminadas.

Akkaya et al. (2008) avaliaram a prevalência de *Salmonella* spp. em 250 carcaças de bovinos abatidos na Turquia, sendo esta de 10%.

Em nosso estudo, a localização dos isolados de *Salmonella* confirma que a operação do abate foi executada de forma higiênica, pois mostra uma contaminação maior do patógeno no

início da linha de abate (ponto A), com um declínio gradual (ponto B), chegando à nulidade ao final do processo.

Do ponto de vista sanitário e da inocuidade de alimentos, tais dados são importantes, já que *Salmonella* spp. é considerada um dos micro-organismos mais incriminados na contaminação da carne bovina e como agente de ETA envolvendo este alimento (JAY, 2005)

Segundo Gill (2004), grande parte das bactérias que contaminam a carne é originária da pele animal. Estudos têm demonstrado que a prevalência de *Salmonella* spp. na pele bovina pode ser alta e a mesma atuar como fonte potencial de contaminação das carcaças durante a esfola (AVERY et al., 2002; ELDER et al., 2000).

Nossos resultados, não somente para *Salmonella*, mas também em relação aos demais patógenos pesquisados, mostram que as operações de abate foram realizadas com base em programas de auto controle implementados pelo estabelecimento avaliado, sendo que os resultados obtidos atestam a sua efetividade.

5.4 – Micro-organismos Indicadores

Das 100 carcaças coletadas, obtivemos um total de 299 amostras (3 pontos por animal, sendo que uma amostra no ponto C foi perdida).

Os valores gerais da tabela 2, apresentados na forma original (UFC/cm²) e em notação logarítmica independentemente do ponto de coleta das amostras, permitem que tenhamos uma visão global das contagens dos indicadores nas carcaças avaliadas. Com base nestes dados, que refletem as condições de abate no presente estabelecimento, pode-se estabelecer parâmetros aceitáveis, bem como metas de redução dos mesmos, sendo portanto um

instrumento auxiliar às Boas Práticas de Fabricação e aos Programas de autocontrole das indústrias.

Tabela 2. Medidas resumo-numéricas das Contagens dos micro-organismos indicadores.

	Mesófilos	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
Percentis (UFC/cm ²)			
Min	0	0	0
25%	50	0	0
50%	625	5	2
75%	8350	51	28
Max	6300000	37000	24000
N	299	299	299
Média Geométrica (intervalo de confiança 95%)	803 (526-1226)	13 (9-18)	9 (7-13)
Log10			
Média	2.90	1.10	0.97
Desvio Padrão	1.62	1.31	1.27
Min	0	0	0
Max	6.80	4.57	4.38

5.4.1 – Aeróbios mesófilos

Segundo Zweifel e Stephan (2003), a quantificação da população de micro-organismos aeróbios mesófilos das superfícies das carcaças é comumente utilizada para fornecer dados que indiquem o grau de cuidados higiênico-sanitários durante as operações de abate, particularmente a esola e a evisceração. De acordo com Ingram e Roberts (1976), falhas durante mudanças na tecnologia de abate podem ser um dos fatores determinantes dos altos valores para a contagem deste grupo de indicadores.

A tabela 3 reporta as médias geométricas das contagens de mesófilos obtidas nos diferentes pontos amostrados. Observa-se uma tendência à redução ao longo das etapas. Nas figuras 26 e 27 os valores são apresentados na escala logarítmica.

As análises estatísticas demonstram que existe diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre todos os pontos (A, B e C).

Observa-se um discreto aumento das contagens do ponto B para o ponto C. Alguns fatores podem explicar essa tendência, como por exemplo: a etapa da lavagem das carcaças disseminar uma contaminação existente nas áreas posteriores do animal em direção às anteriores por escoamento da água de lavagem nesta direção; outra hipótese consiste em atribuir a contaminação às etapas anteriores ao chuveiro e posteriores à esfola como a evisceração e serragem da carcaça ao meio; ainda há a hipótese de contaminação por meio do funcionário responsável pelo desvio das carcaças em direção às câmaras frias, pois nesta etapa as peças não são conduzidas automaticamente pela nória e sim empurradas manualmente.

Tabela 3: Média Geométrica das contagens de Mesófilos (UFC/cm²) nos diferentes pontos de coleta e seus respectivos intervalos de confiança (IC) 95%.

Mesófilos	Média Geométrica	Intervalo de Confiança
Ponto A	26483 ^a	(15536 – 45145)
Ponto B	63 ^b	(37 – 108)
Ponto C	311 ^c	(182 – 531)

* Diferentes letras minúsculas na vertical, indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

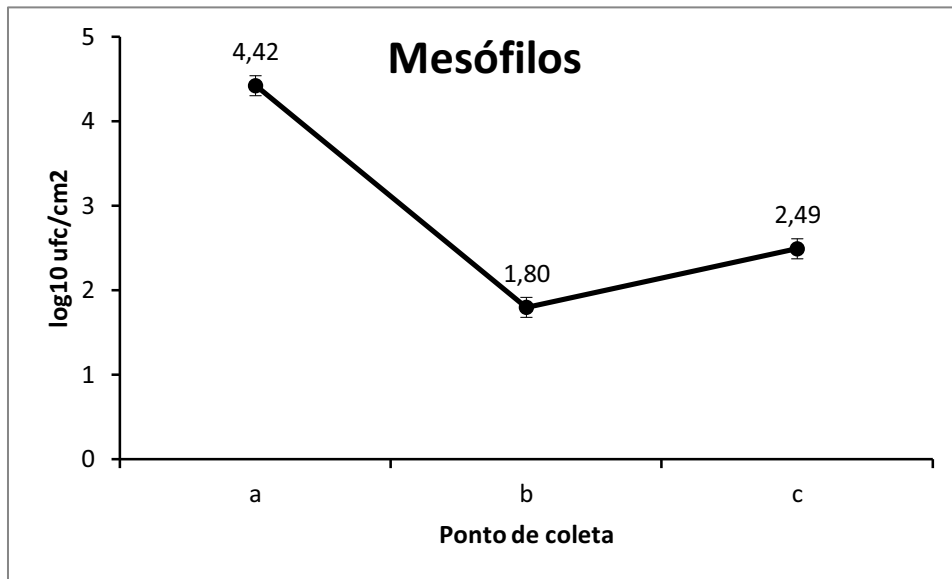


Figura 26. Representação da distribuição das médias (erro padrão) das contagens de Mesófilos (log UFC/mL) nos diferentes pontos de coleta.

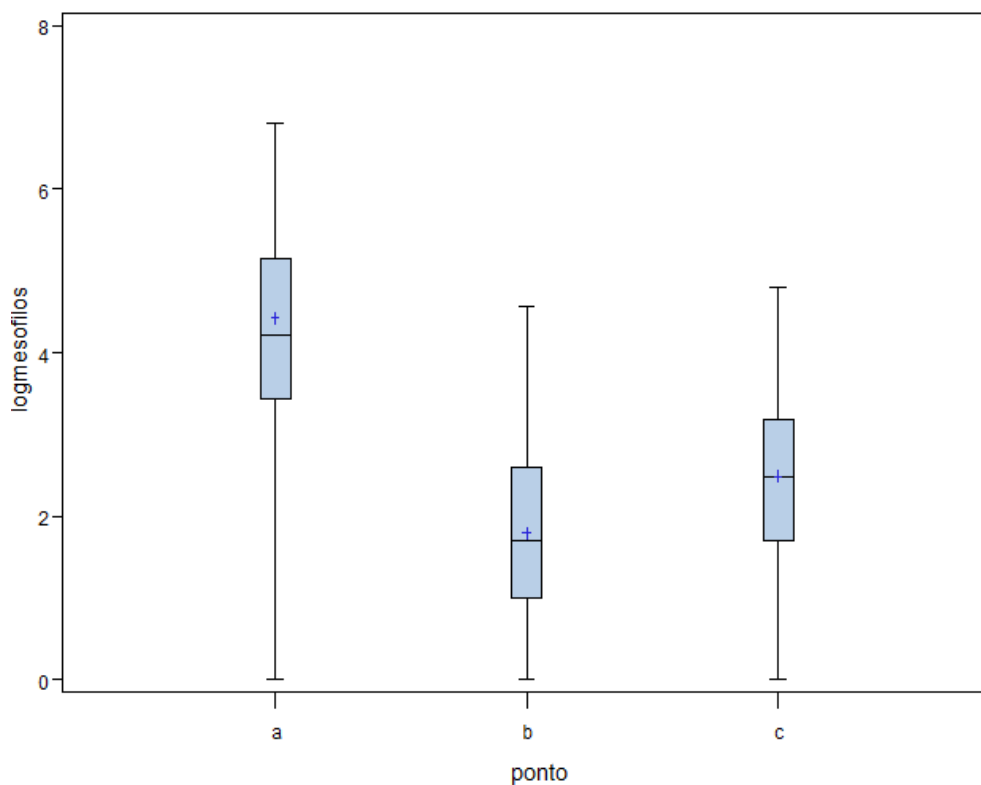


Figura 27. Representação da distribuição das contagens de Mesófilos nos diferentes pontos de coleta (em escala logarítmica) com destaque para os diferentes quartis (25%).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que utilizaram um *design* experimental semelhante ao nosso, com pontos de avaliação ao longo do abate. Assim, torna-se difícil a

comparação de nossos dados com os já publicados. No entanto, em termos gerais, podemos afirmar que as contagens detectadas em nosso estudo são baixas, especialmente as observadas no ponto B, após a esfolação.

Na literatura, alguns dados estão disponíveis. Em pesquisa em quatro abatedouros-frigoríficos, por exemplo, Collobert et al. (2002) analisaram 233 carcaças bovinas encontrando contagem média de $6,0 \times 10^3$ UFC/cm² para a população de micro-organismos mesófilos.

Bacon et al. (2000) observaram que houve uma variação de 8,2 a 12,5 UFC/100 cm² na população de mesófilos na pele animal e que após a esfolação a variação para o mesmo grupo microbiano foi inferior (6,1 a 9,1 UFC/100 cm²).

Brichta-Harhayv et al. (2008) pesquisaram na pele e na carcaça de bovinos abatidos em quatro regiões geograficamente distantes dos Estados Unidos a presença de micro-organismos aeróbios mesófilos, além de micro-organismo patogênicos. A média geométrica em log₁₀ UFC/100cm² nas peles e carcaças pré-evisceração e pós variaram de 6,17 a 8,19; 4,24 a 6,47 e 1,46 a 1,96, respectivamente.

Bell (1997) analisou diferentes regiões da carcaça para contagem padrão de mesófilos e os valores obtidos variaram entre $1,0 \times 10$ até $1,9 \times 10^2$ UFC/cm² após a lavagem das carcaças.

Fontoura et al. (2010) amostraram 40 meias carcaças em abatedouro localizado no interior de São Paulo e encontraram valores médios de $1,8 \times 10$ UFC/cm² na etapa pós lavagem.

5.4.3 – Coliformes Totais

Os coliformes totais e termotolerantes constituem os grupos de micro-organismos indicadores mais empregados na análise de alimentos. *Escherichia coli* é considerada a espécie mais adequada para avaliar a contaminação de origem fecal, sendo que a presença e o número de coliformes totais indicam as condições higiênicas de maneira geral (SILVA et al.,2007).

A tabela 4 reporta as médias geométricas das contagens de Coliformes Totais obtidas nos diferentes pontos amostrados. Observa-se uma tendência à redução ao longo das etapas. Nas figuras 28 e 29 os valores são apresentados na escala logarítmica.

As análises estatísticas demonstram que existe diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) do ponto A em relação aos demais.

Tabela 4. Média Geométrica das contagens de Coliformes Totais (UFC/cm²) nos diferentes pontos de coleta e seus respectivos intervalos de confiança (IC) 95%.

Coliformes Totais	Média Geométrica	Intervalo de Confiança
Ponto A	302 ^a	(203 – 449)
Ponto B	2 ^b	(2 – 4)
Ponto C	3 ^b	(2 – 4)

* Diferentes letras minúsculas na vertical indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,01$)

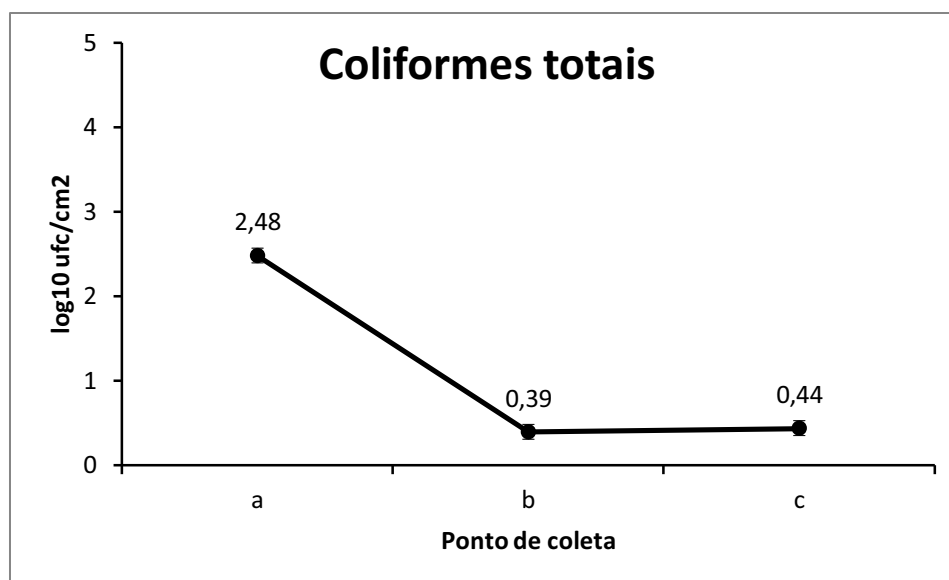


Figura 28. Representação da distribuição das médias (erro padrão) das contagens de Coliformes Totais (log UFC/mL) nos diferentes pontos de coleta.

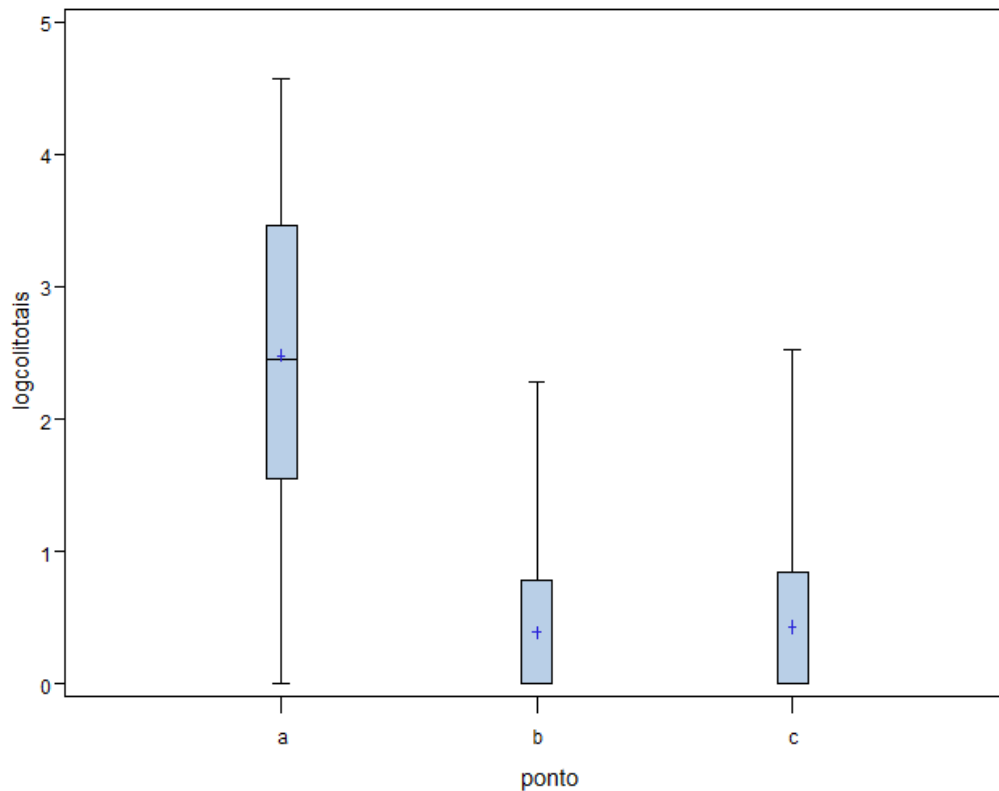


Figura29. Representação da distribuição das contagens de Coliformes Totais nos diferentes pontos de coleta (em escala logarítmica) com destaque para os diferentes quartis (25%).

O mesmo cenário observado para as contagens de mesófilos também se repetiu em relação aos coliformes totais, isto é, uma queda do ponto A para o B, e um leve aumento deste para o ponto C, embora neste caso a diferença não seja significativa.

As contagens observadas são baixas e refletem as boas condições das operações de abate do matadouro-frigorífico em que as colheitas foram realizadas.

Contagens elevadas foram descritas por Sofos et al. (1999), que realizaram enumeração de coliformes totais pela metodologia *Petrifilm*TM. Contagens de até 10^5 UFC/cm², mesmo após a refrigeração, foram detectadas em amostras coletadas de carcaça bovinas durante o processo de abate (pré-evisceração, lavagem e refrigeração).

Filho et al. (2006) pesquisaram os mesmos micro-organismos em 160 meias-carcaças na etapa pós-lavagem e pós refrigeração em dois matadouros-frigoríficos do Estado de Goiás.

As médias obtidas, determinadas pelo número mais provável (NMP) foram de 4,5 NMP/cm² para coliformes totais.

5.4.4 – *Escherichia coli*

A legislação brasileira, RDC nº12 (BRASIL, 2001), não preconiza parâmetros para contagens de coliformes totais, fecais e *Escherichia coli* em carne bovina *in natura*. Entretanto, os Estados Unidos (EUA) estabelecem como exigência aos países exportadores de carne bovina que se enquadrem em seu programa de redução de patógenos, estipulado pelo “Food Safety and Inspection Service” (FSIS), sendo que somente importam lotes previamente testados e comprovadamente dentro dos padrões legais vigentes neste programa. Neste, o limite máximo para *E. coli* é 10²/10cm² da carcaça (USDA, 1996).

A tabela 5 reporta as médias geométricas das contagens de *E. coli* obtidas nos diferentes pontos amostrados. Observa-se uma tendência à redução ao longo das etapas. Nas figuras 30 e 31 os valores são apresentados na escala logarítmica.

As análises estatísticas demonstram que existe diferença estatisticamente significativa (p<0,001) do ponto A em relação aos demais.

Tabela 5. Média Geométrica das contagens de *Escherichia coli* nos diferentes pontos de coleta e seus respectivos intervalos de confiança (IC) 95%.

<i>E.coli</i>	Média Geométrica	Intervalo de Confiança
Ponto A	188 ^a	(127 – 279)
Ponto B	2 ^b	(1 – 3)
Ponto C	2 ^b	(1 – 3)

* Diferentes letras minúsculas na vertical, indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,001$)

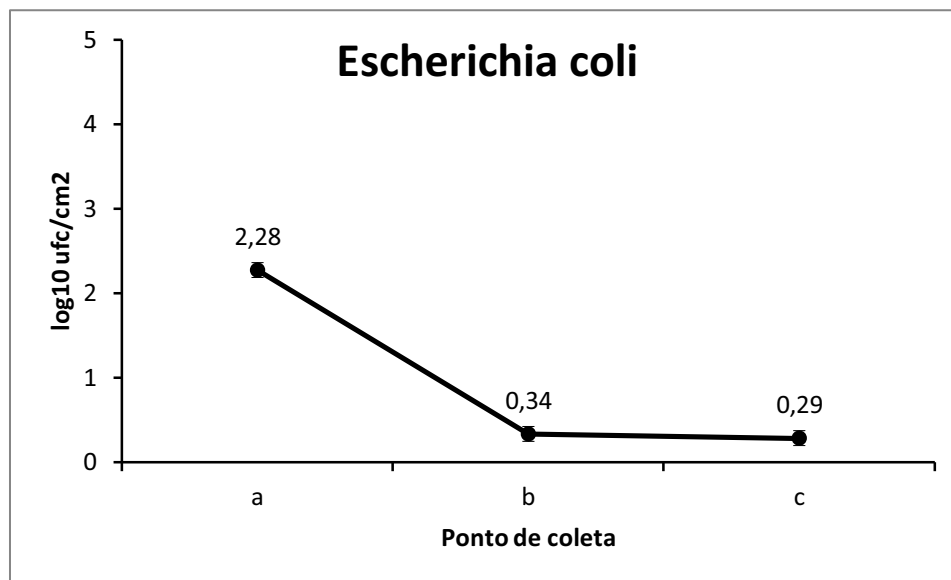


Figura 30. Representação da distribuição das médias (erro padrão) das contagens de *Escherichia coli* (log UFC/mL) nos diferentes pontos de coleta.

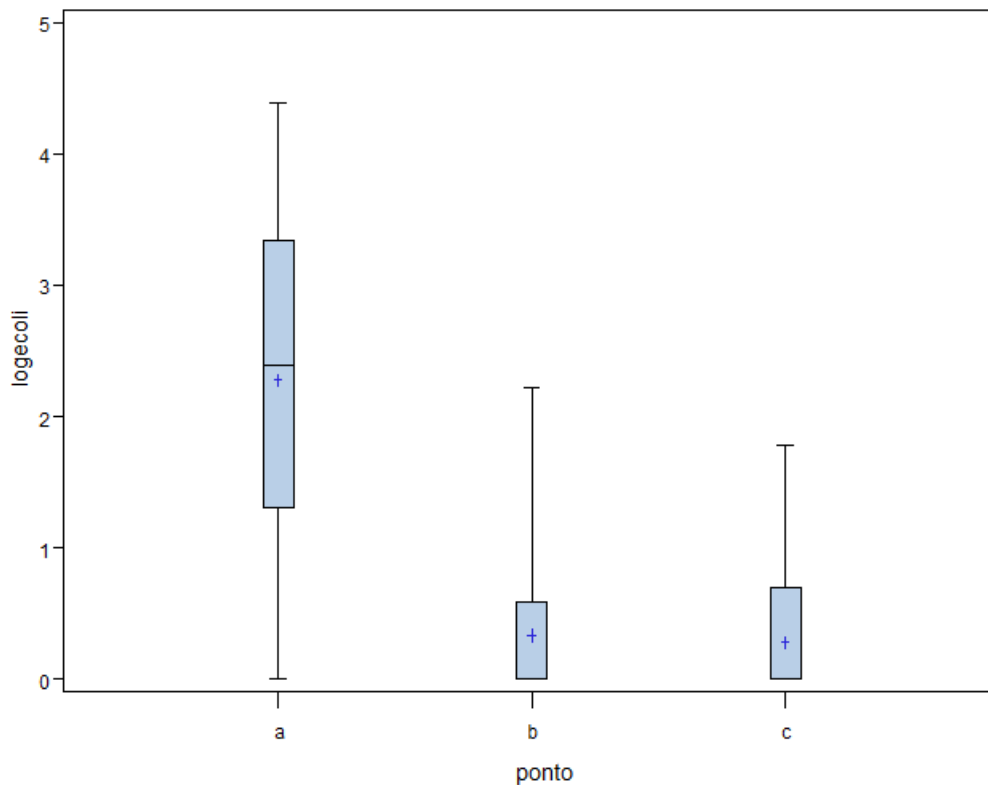


Figura31. Representação da distribuição das contagens de *Escherichia coli* nos diferentes pontos de coleta (em escala logarítmica) com destaque para os diferentes quartis (25%).

Dados da literatura revelam que, por exemplo, Filho et al. (2006) ao pesquisarem o mesmo micro-organismo em 160 meias-carcaças na etapa pós-lavagem e pós refrigeração em dois matadouros-frigoríficos do Estado de Goiás, obtiveram médias, determinadas pelo Número Mais Provável (NMP), de 0,15 NMP/cm².

Lopes (2005) avaliou a ocorrência de *E. coli* e *E.coli* O157:H7 em 60 meia-carcaças bovinas em dois matadouros frigoríficos. Do total analisado, 19 (31,66%) foram positivas para *E.coli*. Porcentagens superiores de contaminação por *E. coli* (43,75%) foram detectadas por Rios (2005) em superfícies de 80 meia-carcaças de bovinos abatidos em dois matadouros frigorífico de Goiânia.

Abdala et al. (2009) pesquisaram no Sudão a presença de vários micro-organismos em 32 carcaças após a esfolagem, evisceração e lavagem em quatro pontos distintos da carcaça (peito, paleta, pescoço e quarto traseiro). Isolaram *Escherichia coli* em 8,86% das amostras.

As contagens observadas em nosso estudo foram baixas e são indicadoras da boa qualidade higiênica das carcaças produzidas no presente matadouro-frigorífico.

5.4.5 Considerações

Para todos os micro-organismos indicadores pesquisados, as amostras do ponto A (pós-sangria) apresentaram contagens bastante superiores quando comparadas às do B (pós-esfolagem) e ponto C (pós-lavagem) (Figuras 26, 28 e 30). Isto ratifica mais uma vez trabalhos anteriores que identificaram a pele dos animais como importante fonte de contaminação, como descrito por Gill em 2004, por exemplo. Acúmulo de fezes e sujidades explicam, portanto, as contagens mais elevadas no ponto A, refletindo uma situação esperada, em que o animal entra para a sala de abate com uma carga microbiológica elevada sobre o pelame. O declínio acentuado das contagens nas etapas subsequentes revela que as condições de manejo na linha de abate deste frigorífico eram adequadas, e as carcaças ao final do processo de abate possuíam uma boa qualidade higiênica.

6.0 – Conclusões

Frente aos dados obtidos e às considerações discutidas neste trabalho, conclui-se que o estabelecimento estudado apresenta qualidade, no seu processo de abate, tanto sanitária

(devido às baixas prevalências dos patógenos) quanto higiênica (devido à acentuada diminuição da carga microbiana de indicadores ao longo da linha).

7.0 - Referências bibliográficas

ABDALLA, M. A.; SULIMAN, S. E.; AHMED, D. E.; BAKHIET, A. O. Estimation of bacterial contamination of indigenous bovine carcasses in Khartoum (Sudan). **African Journal of Microbiology Research**. v. 3, n.12, p. 882-886, December, 2009.

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Disponível em <www.abiec.com.br> Acesso em 15 dez. 2010.

- ADAK, G.K.; MEAKINS, S.M.; YIP, H.; LOPMAN, B.A.; O'BRIEN, S. J. Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.3, p.365-372, 2005.
- ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C. Detection of intimins α , β , γ , δ e ϵ four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **Journal Clinical Microbiology**, v.36, p.662-668, 1998.
- ANDREWS, W.; HAMMACK, T.S. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International, 1998 cap.1.
- ANÔNIMO - United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. nationwide beef microbiological baseline data collection program: cows and bulls. 1996. 33p.
- ANÔNIMO - Recommendations by the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods: The ecology of *Listeria monocytogenes*, USDA, FSIS, Washington, D.C. *International Journal of Food Microbiology*, v.14, p.194-201, 1991.
- AKKAYA, L.; CETINKAYA, Z.; ALISARLI, M.; TELLI, R.; GÖK, V. The prevalence of *E. coli* O157/O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. on bovine carcasses in turkey. **Journal of Muscle Foods**.v.19, n. 4, p. 420-429, October 2008.
- AVERY, S. M.; SMAL, C. A.; REID, S.; BUNCIC. Pulsedfield gel electrophoresis characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from hides of cattle at slaughter. **Journal of food Protection**, v. 65, p.1172-1176, 2002.
- BACON, R. T.; BELK, K. E.; SOFOS, J. N.; CLAYTON, R. P.; REAGAN, J. O.; SMITH, G. C. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. **Journal of Food Protection**, v. 63, p.1080-1086, 2000.
- BARBALHO, T.C.F.; ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, v.16, p. 211-216, 2005.
- BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, p.591-596, 2007.
- BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Salmonella: A Practical Approach to the Organism and its Control in Foods**, Wiley-Blackwell, 2002. 330p.

- BELL, R.G. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. **Journal of Applied microbiology**, v.82, p.292-300, 1997.
- BERESFORD, M.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.1000-1005, 2001.
- BERSOT, L.S.; GILLIO, C.; TAVOLARO, P.; LANDGRAF. M.; FRANCO. B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.3, p.238-240, 2008.
- BETANCOURT, M. R.; SHACKELFORD, S. D.; ARTHUR, T. M.; WESTMORELAND, K. E.; BELLINGER, G.; ROSSMAN, M.; REAGAN, J. O.; KOOHMARAIE, M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. **Journal of Food Protection.**, v.67, n.2, p.295-302, 2004.
- BLACKBURN, C.W.; MCCARTHY, J.D. Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, p.285-290, 2000.
- BORCH, E.; ARINDER. P. Bacteriological safety issues in beef and ready-to-eat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, v.62, p.381-390, 2002.
- BOSILEVAC, J. M.; ARTHUR, T. M.; BONO, J. L.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; KALCHAYANAND, N.; KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and Enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in U.S. Abattoirs that Process Fewer than 1,000 Head of Cattle per Day. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 6, p. 1272-1278, June 2009.
- BOVILL, R.; BEW, J.; COOK, N.; DAGOSTINO, M.; WILKINSON, N.; BARANYI, J. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, p.157-165, 2000.
- BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n. 12. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 janeiro 2001.
- BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. .J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n.7, p. 2465-2467, 2000.

- BRICHTA-HARHAY, D. M.; GUERINI, M. N.; TERRANCE, M. A.; BOSILEVAC, J. M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFOR, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 Contamination on Hides and Carcasses of Cull Cattle Presented for Slaughter in the United States: an Evaluation of Prevalence and Bacterial Loads by Immunomagnetic Separation and Direct Plating Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.6289-6297, n.20, October 2008.
- BUNCIC, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.173-180, 1991.
- CABANES, D.; DEHOUX, P.; DUSSURGET, O.; FRAGEU, L.; COSSART, P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v.10, n.5, p.238-245, 2002.
- CARNEY, E.; O'BRIEN, S.B.; SHERIDAN, J.J.; MCDOWELL, D.A; BLAIR, I.S.; DUFFY, G. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. **Food Microbiology**, v.23, p.52-59, 2006.
- CEBULA, T. A.; PAYNE, W. L.; FENG, P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 248-250, 1995.
- CHAPMEN, P.A.; CERDÁN MALO, A.T.; ELLIN, M.; ASHTON, R.; HARKIN, M.A. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.139-150, 2001.
- CLIVER, D.O. **Foodborne Diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. 395p.
- COIA, J.E. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.20, p.1-9, 1998.
- COLLOBERT, J. F.; DOREY, F.; DIEULEVEUX, V.; QUILLIEN, N. Qualité bactériologique de surface de carcasses de bovines. **Sciences des Aliments**. v.22, p.327-334, 2002.
- COMMISSION REGULATION (EC) N° 1441/2007. amending Regulation (EC) N° 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 18p., 5 December 2007.
- CONNOR, B. A.; SCHWARTZ, E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. **The Lancet Infectious Diseases**; v.5,n.10, p.623-628, 2005.

- COOKSON, A. L.; HAYES, C. M. PEARSON, G. R., ROE, J. M.; WALES, A. D. WOODWARD, M. J. Isolation from a sheep of an attaching and effacing *Escherichia coli* O115:H₇ with a novel combination of virulence factors. **Journal of Medical Microbiology** v.51, p-1041–1049, 2007.
- CORDANO, A. M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.175-178, 2001.
- CULLOR, J.S. Common pathogens that cause foodborne disease: can they be controlled on the dairy? **Veterinary Medicine**, v.2, p.185-194, 1995.
- D'AOUST, J. Y.; MAURER, J.; BAILEY, J. S. Salmonella species. In DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Eds). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2001. p.141-178.
- D'SILVA, J. Factory farming and developing countries: a compassion in world farming trust briefing. Petersfield: Compassion in World Farming Trust, 2000. Disponível em <www.ciwf.co.uk> Acesso em: 07 out. 2008.
- DESTRO, M.T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.191-196, 2000.
- DICKSON, J.S.; MACNEIL, M.D. Contamination of beef tissue surfaces by cattle manure inoculated with *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.54, p.102-104, 1991.
- DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. **Infection and Immunity**, v.59, p.4310–4317, 1991.
- DYKES, G.A Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.301-306, 2003.
- DYKES, G.A., MOORHEAD, S.M. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, p.161-166, 2000.
- DYKES, G.A.; MOORHEAD, S.M. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.71-81, 2001.

- EISEL, W.G.; LINTON, R.H.; MURIANA, P.M. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a processing plant. **Food Microbiology**, v.14, p.273-282, 1997.
- ELDER, R. O.; KEEN, G. R.; SIRAGUSA, G. A.; BARKOCY-GALLAGHER, M. K.; LAEGREID, W. W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. **Proceeding of National Academic Science, USA**, v.97, 2000.
- FANTELLI, K.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.63-69, 2001.
- FARMER III, J. J.; MCWHORTER, A. C.; MORRIS, G. K.; BRENNER, D. J. The Salmonella-Arizona group of Enterobacteriaceae: nomenclature, classification, and reporting. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.6, n.9, p. 63-6, 1984.
- FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. Disponível on-line <https://www.fao.org.br/dmaCD.asp>, acesso dia 05 jan 2012.
- FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual. Disponível on-line <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>>, acesso dia 07 out 2010.
- FENLON, D.R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **Journal of Applied Bacteriology**, v.59, p.537-543, 1985.
- FENLON, D. R. WILSON, J. DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **Journal of Applied Bacteriology**. 1996. 81: 6, 641-650.
- FILHO, A. T. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; BUENO, C. P.; LOPES, J. H.; COUTO, M.V.; BORGES, N. M. F. Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n. 3, 2006.
- FONTOURA, C. L.; ROSSI, J. O. D.; MARTINELLI, T. M.; CERESER N. D.; Estudo Microbiológico em Carcaças Bovinas e Influência da Refrigeração sobre a Microbiota Contaminante. **Arquivo Instituto Biológico**, v.77, n.2, p.189-193, 2010.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

- GARCIA, J.A.; DOMINGUEZ, L.; BRIONES, V.; BLANCO, M.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; SUAREZ, G. Revision of the antigenic structure of genus *Listeria*. **FEMS Microbiology Letters**, v.67, p.113-120, 1990.
- GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.01-15, 2007.
- GILL, C.O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A.; BOARD, R. (Eds.) **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998, p. 118-157.
- GILL, C.O. Visible Contamination on Animals and Carcasses and the Microbiological Condition of meat. **Journal of Food Protection**, v.67, n. 2, p.413-419, 2004.
- GIOMBELLI, A.; SILVA, N. L. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carnes *in natura*. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n.87, p.63-66, 2001.
- GOMBOSSY, B. D. M. F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Livraria Atheneu, 2003.
- GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M.-L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A.-M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, n. 21, p. 217-225, 2004.
- GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, A.D.; WEILL, F. X. Supplement 2003-2007 (nº47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Reserch in Microbiology**. V.161, P. 26-29, 2010.
- GUTH, B.E.C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; CERQUEIRA, A.M.F.; CHILLEMI, G.; ANDRADE, J.R.C.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.335-349, 2003.
- GYLES, E. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **Journal of Animal Science**, v. 35, p.45-62, 2006.
- HANSSON, I. B. Microbiological meat quality in high- and low-capacity slaughterhouses in Sweden. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 6, p.820-825, 2001.
- HELMS, M.; SIMONSEN, J.; MOLBAK, K. Foodborn bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, n.4, p. 498-506, 2006.

- HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, n.1, p.9-18, 1995.
- HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.145-153, 1997.
- INGRAM, M.; ROBERTS, T. A. The microbiology of the red meat carcass and the slaughterhouse. **Journal of the Royal Society of Health**, v. 96, n. 6, p. 270- 276, 1976.
- INTERNACIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **Microrganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1984. p.431.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 6579. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.**, 4th ed, 2002.
- ISO 11290-1. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method**. 1ª edição. 1996. The International Organization for Standardization, Amendment 1: 10/05/2011.
- ISO 11290-2. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method**. 1ª edição. 1996. The International Organization for Standardization, Amendment 1: 10/05/2011.
- ISSO 6579. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method of detection of *Salmonella* spp.** 4ª edição. 2002. The International Organization for Standardization, Amendment 1: 15/10/2010.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**, 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.771.
- JOHNSTON, A.M. Animal health and food safety. **British Medical Bulletin**, v.56, p.51-61, 2000.
- KALAC, P. A review of some aspects of possible association between feeding of silage and animal health. **British Veterinary Journal**, v.138, p.314-315, 1982.
- KAPER, J.B., ELLIOTT, S., SPERANDIO, V., PERNA, N.T., MAYHEW, G.F., BLATTNER, F.R. Attaching and effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In: KAPER, J.B., OVBRIEN, A.D. (Eds.), **Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing E. coli Strains**. A.S.M., Washington, DC, pp. 163–182, 1998.

- KEOGH, E.; KERR, M.; McGUIRE, L.; SHERIDAN, J. J. The extent of faecal and bacterial contamination of beef carcasses. In: DUFFY, G., GARVEY, P., COIA, J., WASTESON, Y. AND MCDOWELL, D.A Concerted Action CT98-3935, verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. **Epidemiology of Verocytotoxigenic *E. coli*. Dublin: The National Food Centre, 2001.** p. 141.
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. L.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.18, p.775-779, 1977.
- LECUIT, M.; VANDORMAEL-POUMIN S.; LEFORT J.; HUERRE M.; GOUUNON P.; DUPUY C.; BABINET, C.; COSSART, P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. **Science**. v. 292, p.1722-1725, 2001.
- LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P. Infecções e intoxicações alimentares. In: **Aspectos da ciência e tecnologia de alimentos**. 1 ed. João Pessoa, PB: Nova Idéia,v. 1, p. 175-199, 2002.
- LITTELL, R. C., G. A. MILLIKEN, W. W. STROUP, R. D. WOLFINGER & O. SCHABENBERGER. 2006. **SAS for Mixed Models**. 2nd ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- LOPES, J. H. **Ocorrência de coliformes, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7 em meias carcaças bovinas quentes e resfriadas em matadouros-frigoríficos de Goiás, sob inspeção federal. 2005.** Dissertação (Mestrado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- MADEN, R.H.; ESPIE, W.E.; MORAN, L.; MCBRIDE, J.; SCATES, P. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in Northern Ireland. **Meat Science**, v.58, p.343-346, 2001.
- MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.207-212, 1998.
- MARQUES, S. C.; BOARI, C. A.; BRCKO, C. C.; NASCIMENTO, A. R.; PICCOLI, R. H. Avaliação higiênico-sanitária de lingüiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras - MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 1120-1123, 2006.
- MASCOLA, L.; SORVILLO, F.; GOULET, V.; HALL, B.; WEAVER, R.; LINNAN, M. Faecal carriage of *Listeria monocytogenes*: Observations during a community-wide, common-source outbreak. **Clinical Infectious Disease**, v.15, p.557-558, 1992.
- McEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A. The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen, and carcass samples at a commercial abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.693-700, 2003.

- McLAUHLIN, J.; HALL, S.M.; VELANI, S.K.; GILBERT, R.J. Human listeriosis and pate: a possible association. **British Medical Journal**, v.303, p.773-775, 1991.
- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infection Disease**, v.5, p.607-625, 1999.
- MELTON-CELSA, A.R.; O'BRIEN A. Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: KAPER J.B., O'BRIEN A.D. Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin producing E. coli strains. Washington, DC, **American Society for Microbiology**, p. 121-128. 1998.
- MMWR - CDC. Listeriosis associated with consumption of turkey franks. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.38, p.267-268, 1989.
- MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, v.1, p.107-121, 2004.
- MORGAN, D.; MAWER, S. L.; HARMAN, P. L. The role of home-made ice cream as a vehicle of Salmonella enteritidis phage type 4 infection from fresh shell eggs. **Epidemiology and Infection**, v.113, n. 1, p. 21-29, 1994.
- NESBAKKEN, T.; KAPPERUD, G.; CAUGANT, D.A. Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p.161-171, 1996.
- NORRUNG, B.; ANDERSEN, J.K.; SCHLUNDT, J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, p.195-203, 1999.
- NOUICHI, S.; HAMDY, T. M. Superficial Bacterial Contamination of Ovine and Bovine Carcasses at El-Harrach Slaughterhouse (Algeria). **European Journal of Scientific**. v.38, n.3, p.474-485, 2009.
- OLIVEIRA, M. G.; GANDRA, T. K. V.; ROSA, J. V. DA; PRATES, D. F.; SILVA, W. P. **Monitoramento de *Listeria* spp. na serra utilizada para divisão de carcaças e após a etapa de evisceração na linha de abate de bovinos**. XIX CIC – XII ENPOS – Mostra científica 2010. Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/cic/2010/cd/pdf/CA/CA_00501.pdf Acesso em 10/01/2012.
- OLIVEIRA, S.; SILVA, J. A.; MACIEL, J. F.; AQUINO, J. S. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de carne bovina comercializada em supermercados de João Pessoa. **Alimentação Nutrição**. Araraquara, v.19, n.1, p. 61-66, 2008.

- PAGOTTO, F.; CORNEAU, N.; FARBER, J. *Listeria monocytogenes* infections In: RIEMANN, H.; CLIVER, D., eds. **Foodborne infections and intoxications**. 3.ed. New York, London: Academic Press, 2006. cap.9, p.313–340.
- PECCIO, A.; AUTIO, T.; KORKEALA, H.; ROSMINI, R.; TREVISANI, M. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p. 234-238, 2003.
- PELL, A.N. Manure and Microbes: Public and Animal Health Problem? **Journal of Dairy Science**, v.80, p.2673-2681, 1997.
- PERRY, C.M.; DONNELLY, C.W. Incidence of *Listeria monocytogenes* in silage and its subsequent control by specific and nonspecific antagonism. **Journal of Food Protection**, v.53, p.642-647, 1990.
- PETERSEN, L.; MADSEN, M. *Listeria* spp. in broiler flocks: recovery rates and species distribution investigated by conventional culture and the EiaFoss method. **International Journal of Food Microbiology**, v.58, p.113-116, 2000.
- PHILLIPS, C.A. The epidemiology, detection and control of *Escherichia coli* O157. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.79, p.1367-1381, 1999.
- PHILLIPS, D.; SUMNER, J.; ALEXANDER, J. F.; DUTTON, K. M. Microbiological quality of Australian beef. **Journal of Food Protection**, v.64, n.5, p.692-696, 2001.
- PIERSON, M. D.; SMOOT, L. M. Indicator microorganisms and microbiological criteria. In: DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L.R.; MONTIVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2001.
- PIGATTO, C. P.; CALOMENO, M. A.; BACILA, M. Analysis of the microbial population in the water used for carcass washing and in bovine carcass at a slaughter house. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 43-46, 2003.
- POPOFF, M. Y.; LE MINOR, **Antigenic formulas of the Salmonella serovars**. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. 7 ed. Paris: Institut Pasteur, 1997.
- POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. The genus *Salmonella*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J. T., Eds. **Bergey's manual of systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2005. v. 2, p. 764-799.

- REIS, R. B.; KRUGER, C. S.; MACIEL, M. S. *Salmonella spp.* em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá-MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.15, p.74-78; 1995.
- RIGOBELLO, E. C.; MALUTA, R. P; BORGES C. A; BERALDO, L. G.; FRANCO, M. V.; MAESTÁ, L. S. A.; ÁVILA, F. A. Contamination of cattle carcasses by *Escherichia coli* shiga like toxin with high antimicrobials resistance. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 5(16), pp. 2217-2221, 18 August, 2011.
- RIOS, E.R. **Detecção de E.coli e E. coli O157:H7 em superfície de meias-carcaças de bovinos abatidos em estabelecimento sob inspeção federal em Goiânia-GO.** Dissertação- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2005.
- ROÇA, R.O. **Microbiologia da Carne.** UNESP, Campus de Botucatu, 2004. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/tecarne.htm#s5>. >Acesso em: 20 de fevereiro 2010.
- ROCOURT, J.; JACQUET, C.H.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.197-209, 2000.
- RORVIK, L.M.; YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, p.97-104, 1991.
- RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety.** 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1999. 738p.
- SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach.** Washington: ASM, 1994. p.418.
- SALVATORI, R. U.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. R. D. I. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto Alegre- RS. **Ciência Rural**, v. 33, p. 771-773, 2003.
- SANAA, M.; POUTREL, B.; MENARD, J.L.; SERIEYS, F. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2891-2898, 1993.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT 9.2 User's Guide.** 2nd ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- SCHMIDT, H., L. BEUTIN, AND H. KARCH. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, v.63, p-1055–1061, 1995.

- SCHMIDT, H.; H. KARCH. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**. v.34, p.2364– 2367, 1996.
- SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C.V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, p.169-183, 1991.
- SEELIGER, H.P.R.; HOHNE, K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: BERGAN, T. & NORRIS, J.R. (Eds.). **Methods in Microbiology** (pp. 31-49). London: Academic Press. 1979.
- SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from low-pH, nitrate-and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. Nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2959-65, 2004.
- SILVA, J. A. Microbiologia da carcaça bovina: uma revisão. **Revista Nacional da Carne**, v. 24, p.62-87, 1997.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, 3 ed. São Paulo: Varela, 2007.p. 552.
- SIMMONS, N.A. Global perspectives on *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxic *E. coli* spp.: UK views. **Journal of Food Protection**, v.60, p.1463-1465, 1997.
- SIRAGUSA, G.R.; DICKSON, J.S.; DANIELS, E.K. Isolation of *Listeria* spp. from feces of feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, v.56, p102-105/109, 1993.
- SKIDMORE, A.G. Listeriosis at Vancouver General Hospital, 1965-79. **Canadian Medical Association**, v.125, p.1217-1221, 1981.
- SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. eds. **Listeria, Listeriosis and Food Safety: Food Science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1999. P.75-95.
- SMITH, W. E.; KANE, A. V.; CAMPBELL, S. T.; ACHESON, D. W.; COCHRAN, B. H.; THORPE, C. M. Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.71, p.1497– 1504, 2003.

- SOFOS, J.N.; KOICHEVAR, S.L.; BELLINGER, R.G.; BUIGE, D.R.; HANCOCK, D.D.; INGHAM, S.C.; MORGAN, J.B.; REAGAN, J.O.; SMITH, G.C. Sources and extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United States slaughtering plants. **Journal of Food Protection**, v.62, n.2, p.140-145, 1999.
- SOUZA, C. L.; JOELLE, M. R. S. P. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-químico de carne bovina moída em açougues do município de Macapá – AP. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 72, p.60-65, 2000.
- STROCKBINE, N.A.; JACKSON, M.P.; SUNG, L.M.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. **Journal of Bacteriology**. v.170, p.1116–1122, 1986.
- SYNGE, B.A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a veterinary view. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.315-375, 2000.
- TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Early events and pattern formation in *Listeria monocytogenes* biofilmes. **Biofilms**, v.1, p.351-359, 2004.
- TOPLEY, W.W.C.; WILSON, G.S. **The principles of bacteriology and immunity**, Volume II. London - UK: Edward Arnold and Co.,1929b. pp. 1037-1038.
- TUTENEL, A.V.; PIERARD, D.; VAN HOOFF, J.; CORNELIS, M.; DE ZUTTER, L. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle, pigs and chicken at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.63-69, 2003.
- UNFPA - FUNDO DE POPULAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Disponível em: <http://port.pravda.ru/sociedade/03-11-2011/32404-populacao_mundial-0/>. Acesso em 15/12/2012.
- USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Food Safety and Inspection Service. Pathogen Reduction / Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems / Specific Sample Collection Procedure CRF / Part 304, **Rules and Regulations 38931**, Washington: USDA, v. 144, n. 61, 1996.
- VANDERLINDE, P. B.; SHAY, B.; MURRAY, J. Microbiological Quality of Australian Beef Carcass Meat and Frozen Bulk Packed Beef. **Journal of Food Protection**, v.61, n. 4, p.437-443, 1998.
- VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1996. p.873.

VARNAN, A. H.; EVANS, M. G. *Salmonella*. In: **Foodborne Pathogens**. St. Louis: Mosby Year Book; London: Wolf, 1991. p. 51-85.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.584-640, 2001.

VOUGHT, K. J.; TATINI, S. R. *Salmonella enteritidis* contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 1, p. 5-10, 1998.

WERBROUCK, H.; GRIJSPEERDT, K.; BOTTELDOORN, N.; PAMEL, E.V.; RIJPENS, N.; VAN DAMME, J.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L.; VAN COILLIE, E. Differential *inlA* and *inlB* expression and interaction with human intestinal and liver cells by *Listeria monocytogenes* strains of different origins. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 72 no. 6, 2006.

World Health Organization – WHO. 1999-2000. Disponível em: <http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm>. Acesso em: 10 nov. 2010.

ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Microbiological monitoring of sheep carcass contamination in three swiss abattoirs. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 6, p. 946-952, 2003.