

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM BOVINOS
ABATIDOS EM ESTABELECIMENTO HABILITADO À
EXPORTAÇÃO NA CIDADE DE BARRETOS Ë SP, BRASIL.**

**Camila Barbieri Prata
Médica Veterinária**

**JABOTICABAL Ë SÃO PAULO Ë BRASIL
2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM BOVINOS
ABATIDOS EM ESTABELECIMENTO HABILITADO À
EXPORTAÇÃO NA CIDADE DE BARRETOS Ë SP, BRASIL.**

Camila Barbieri Prata

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Ë UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL Ë SÃO PAULO Ë BRASIL

Novembro de 2009

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CAMILA BARBIERI PRATA . Nascida em 27 de Maio de 1982 na cidade de Campinas . SP. Concluiu o ensino médio no Colégio Santo André de Jaboticabal, em dezembro de 1999. Iniciou o curso de Medicina Veterinária, em março de 2001, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal . UNESP, concluindo em dezembro de 2005. Durante o curso de graduação, participou do Programa de Educação Tutorial PET . CAPES Medicina Veterinária, sendo voluntária durante o período de agosto de 2002 a abril de 2004, tornando-se bolsista, a partir dessa data, até junho de 2005. De agosto de 2002 a julho de 2003, realizou trabalho de iniciação científica, com bolsa CNPq/PIBIC, intitulado Susceptibilidade *In Vitro* de cepas de *Staphylococcus spp* isoladas de propriedades leiteiras caprinas. Ao final da graduação, participou do programa US-Brazil Higher Education Consortia, um convênio CAPES-FIPSE, junto às universidades University of Louisiana . LSU e University of Minnesota . UMN, com início em agosto de 2005 e término em dezembro do mesmo ano, com a apresentação do Trabalho de Graduação intitulado Novas Abordagens para o controle da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos. Em abril de 2006, foi contratada pela empresa JBS Friboi para integrar a Equipe Friboi Quality Farms e prover assistência técnica aos pecuaristas fornecedores do grupo. Ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária do programa de Pós-Graduação da FCAV . UNESP de Jaboticabal em agosto de 2007.

DEDICATÓRIA

A meu pai,

*Fruto de enganos ou de amor,
nasço de minha própria contradição.*

*O contorno da boca,
a forma da mão, o jeito de andar
(sonhos e temores incluídos)
virão desses que me formaram.*

*Mas o que eu traçar no espelho
há de se armar também
segundo o meu desejo.*

*Terei meu par de asas
cujo vôo se levanta desses
que me dão a sombra onde eu cresço
- como, debaixo da árvore,*

*um caule
e sua flor.*

(Lya Luft)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos. A receptividade e a orientação, somados ao apoio, ensino e confiança foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos Profs. Dr. Fernando Ávila, Dr. Felipe Perecin, Dr. Luiz Augusto do Amaral, Dra. Adolorata Aparecido Bianco Carvalho, pelo incentivo e pelas valiosas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

A toda equipe do laboratório do Frigorífico, em especial a Paula e Tânia; e a Andréa Frezza, o tempo despendido e os ensinamentos possibilitaram a realização desta pesquisa.

À Kelly Caselani pelo companheirismo durante a realização deste trabalho.

A Leonel Almeida, por compreender a importância deste trabalho e pelo incentivo durante sua realização.

À minha família, pelo carinho incondicional, ensinamentos e críticas, compreensão e principalmente pelo amor demonstrado todos os dias. A meus pais, Alda e Luiz, fonte maior de inspiração, pelo exemplo de vida e caráter. Amo vocês!

Às amigas Francine e Luciana que, mesmo distantes, estiveram sempre presentes.

Ao meu namorado, José Fernando, por me encorajar e lembrar que tudo vai dar certo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O uso de indicadores higiênico-sanitários em alimentos	5
2.2. Caracterização da <i>Escherichia coli</i>	7
2.3. Classificação de <i>Escherichia coli</i> em Sorotipos	8
2.4. Classificação de <i>Escherichia coli</i> em Patotipos	9
2.5. Doenças provocadas pela <i>Escherichia coli</i> Shiga Toxigênica (STEC)	11
2.6. Fatores de virulência da <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	14
2.7. Bovinos como reservatórios de <i>Escherichia coli</i>	17
2.8. Ocorrência de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	19
2.9. Detecção de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 através da reação de polimerase em cadeia (PCR)	22
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos Específicos	25

4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Caracterização da indústria	27
4.2. Amostragem	27
4.3. Colheita das Amostras	28
4.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	29
4.5. Análises Microbiológicas . Indicadores	31
4.6. Análise Estatística	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS	58

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Resultados obtidos da avaliação de carcaças quentes e carcaças refrigeradas para os métodos indicadores de contaminação (contagem total de microorganismos viáveis, coliformes totais e <i>E. coli</i>), apresentados em log ₁₀ UFC/cm ²	35
2. Classificação dos resultados obtidos da avaliação de carcaças quentes e carcaças refrigeradas para os métodos indicadores de contaminação (contagem total de microorganismos viáveis, coliformes totais e <i>E. coli</i>), interpretados de acordo com critérios recomendados para as indústrias de carne (Food Standards Agency, 2007). Barretos, SP. Brasil	46
3. Resultados e respectiva frequência da ocorrência para a pesquisa de <i>E. coli</i> O157:H7 em amostras de carcaças, de suabe retal e de recortes da desossa durante o abate de bovinos terminados a pasto e em confinamento. Barretos, SP. Brasil	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Esquematização de carcaça bovina com identificação dos locais de coleta das amostras	29
2. Perfil da curva de dissociação positiva para E. coli O157:H7 apresentada pelo teste BAX® system da DuPont Qualicon	31
3. Perfil da curva de dissociação negativa para E. coli O157:H7 apresentada pelo teste BAX® system da DuPont Qualicon	31
4. Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça quente de animais a pasto para a contagem total de microorganismos viáveis . \log_{10} UFC/cm ² . (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória)	37
5. Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça quente de animais confinados para a contagem total de microorganismos viáveis - \log_{10} UFC/cm ² . (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória)	37
6. Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça fria de animais a pasto para a contagem de coliformes totais - \log_{10} UFC/cm ² . (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória)	40

7. Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça fria de animais confinados para a contagem de coliformes totais - \log_{10} UFC/cm². (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória) 40
8. Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça fria de animais a pasto para a contagem de *Escherichia coli* - \log_{10} UFC/cm². (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória) 41
9. Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça fria de animais confinados para a contagem de *Escherichia coli* - \log_{10} UFC/cm². (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória) 41
10. Percentual dos resultados da contagem total de microorganismos viáveis em amostras de carcaça de animais alimentados a pasto e em confinamento classificadas em satisfatório, aceitável e insatisfatório, de acordo com os critérios do *Meat Industry Guidelines* de 2007, da *Food Standards Agency*, Reino Unido 43
11. Percentual dos resultados da pesquisa de coliformes totais em amostras de carcaça de animais alimentados a pasto e em confinamento classificadas em satisfatório, aceitável e insatisfatório, de acordo com os critérios do *Meat Industry Guidelines* de 2007, da *Food Standards Agency*, Reino Unido 43
12. Percentual dos resultados da pesquisa de *Escherichia coli* em amostras de carcaça de animais alimentados a pasto e em confinamento classificadas

em satisfatório, aceitável e insatisfatório, de acordo com os critérios do <i>Meat Industry Guidelines</i> de 2007, da <i>Food Standards Agency</i> , Reino Unido	44
13. Resultados da pesquisa de <i>E. coli</i> O157:H7 em amostras de suabe retal, de carcaças e de recortes da desossa durante o abate de bovinos. Barretos, SP. Brasil	47
14. Lote de animais terminados a pasto durante o jejum de pré abate nos currais da indústria	51
15. Lote de animais terminados em confinamento durante o jejum de pré abate nos currais da indústria	52
16. Curral de pré abate com utilização de aspersores de água	52
17. Banho de aspersão imediatamente à saída dos currais pré abate (água hiperclorada e pressão mínima de 3 ATM)	53

OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM BOVINOS ABATIDOS EM ESTABELECIMENTO HABILITADO À EXPORTAÇÃO NA CIDADE DE BARRETOS - SP, BRASIL.

RESUMO - *Escherichia coli* O157:H7 é uma cepa de importância crescente por estar associada a vários surtos graves de doença em humanos, a maioria derivada do consumo de carne bovina crua ou mal cozida. Os bovinos constituem seu reservatório mais importante, aventando-se a hipótese de que mudanças do regime alimentar em confinamentos atuariam favoravelmente ao aparecimento de cepas shigatoxigênicas. Neste estudo objetivou-se verificar, comparativamente durante o abate, a prevalência desse sorotipo e o comportamento de métodos indicadores como a contagem total de microrganismos viáveis (CTMV) e de contaminação fecal - coliformes totais e *E. coli*, em amostras de fezes e em carcaças de bovinos terminados a pasto e em confinamento, possibilitando a disponibilização de subsídios necessários aos programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e de Análise de Risco (RA), empregados na redução do risco de doenças transmitidas por alimentos. Identificados os lotes de acordo com a terminação (dez de cada tipo), desses foram aleatoriamente colhidas e analisadas 100 amostras de suabe retal, 100 amostras de carcaças e 67 amostras de %recortes+da desossa (carne industrial) utilizando-se, para a *E. coli* O157-H7, técnica automatizada de PCR. À exceção de uma única amostra de recortes (0,37%), as demais, tanto de fezes quanto de carcaças, foram negativas para a cepa pesquisada. Além de constatar-se uma prevalência muito baixa, não se evidenciou diferenças entre os tipos de terminação dos animais. Os resultados dos indicadores - CTMV, de coliformes totais e *E. coli*, foram considerados aceitáveis em 91%, 85% e 93% das amostras, respectivamente, oferecendo suporte e concordância com a baixa prevalência encontrada.

Palavras-chave: *E. coli* O157:H7, PCR, bovinos, terminação a pasto, confinamento.

OCCURRENCE OF *Escherichia coli* O157:H7 IN CATTLE SLAUGHTERED IN ESTABLISHMENT ENABLED TO EXPORT AT BARRETOS Ë SP, BRAZIL.

ABSTRACT - *Escherichia coli* O157:H7 is an important strain that has been associated with outbreaks of serious disease in humans, most being derived from consumption of raw or poorly cooked beef. It is likely that cattle are an important reservoir, suggesting the possibility that changes in feedlot diet favor the emergence of shigatoxigenic strains of *E. coli*. This study is intended to verify, comparatively during bovine slaughter, the occurrence of *E. coli* O157:H7 associated with the sampling results obtained by means of general indicator methods (total viable count) and fecal contamination indicators (coliforms and *E. coli*). Samples will be taken from both excreta and carcasses of cattle finished either on pasture or feedlot, allowing the provision of subsidies necessary for Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) and Risk Analysis (RA) programs and applied in the reduction of the risk of foodborne diseases. After identification of batches according to the type of finishing (feedlot or pasture), samples were randomly collected and analyzed. 100 rectal swabs, 100 samples from carcasses sponging, and 67 samples of "sliced meat" from the boning room (industrial meat). An automatic PCR technique for detection of *E. coli* O157:H7 was used. Except for one sample of sliced meat (0.37%), all others, both for excreta and carcasses, were negative for the O157:H7 *E. coli* strain. There were no significant differences in prevalence between the types of cattle finishing of the animals. The results of the indicators methods (TVC, coliforms and *E. coli*); were considered acceptable in 91%, 85% and 93% of tested samples, respectively, supporting and in agreement with low prevalence of O157:H7 found.

Key words: *E. coli* O157:H7, PCR, bovine, pasture, feedlot.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando faturamento de mais de R\$ 50 bilhões/ano. O Brasil possui um rebanho bovino com cerca de 190 milhões de cabeças, em contínuo crescimento e com avanços nos índices de produtividade. O volume e a regularidade da produção a preços competitivos, face ao consumo internacional crescente, consolidaram o Brasil como líder nas exportações mundiais de carne bovina, com uma participação de 27% e atendendo às expectativas de consumidores exigentes em mais de 180 países (ABIEC, 2009).

A consolidação do Brasil como líder nas exportações naturalmente o coloca numa condição de alvo. Seguindo as exigências do mercado internacional, as indústrias se viram obrigadas a implementar, além da tradicional Inspeção Sanitária, ferramentas como as dos programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e de Análise de Risco (RA) para auxiliar o controle dos perigos, principalmente relacionados com bactérias emergentes, sob a justificativa de que a maioria dos casos de enfermidades transmitidas por alimentos decorre de práticas operacionais inadequadas do ponto de vista higiênico-sanitário. A título de exemplo, desde 1997, o mercado importador norte-americano exige tarefa adicional representada pelo Programa de Redução de Patógenos no abate, com o monitoramento de *Escherichia coli* e de *Salmonella spp.*

Muitos são os padrões bacteriológicos adotados pelos países importadores com o intuito de verificar a qualidade da carne bovina. Apesar da maioria dos microrganismos identificados não apresentar potencial patogênico para humanos, muitos desses ou

seus produtos metabólicos agregam os atributos necessários para serem utilizados como indicadores na avaliação da qualidade microbiológica e da sanidade do produto. A sua presença sugere a ocorrência de contaminação microbiana com possível presença de patógenos ou deterioradores potenciais do alimento, indicando condições sanitárias inadequadas de manipulação, processamento, produção ou armazenamento (ICMSF, 1982).

Dentre os possíveis patógenos encontra-se a *E. coli* O157:H7, por ser os bovinos seu principal reservatório. Essa cepa de *E. coli* produtora de shigatoxinas é altamente patogênica e responsável por enfermidades de natureza grave, como a colite hemorrágica, a síndrome hemolítica urêmica e a púrpura trombocitopênica trombótica, que podem ser fatais, principalmente para crianças e idosos.

No Brasil pouco se conhece a respeito da ocorrência desse microorganismo no rebanho bovino de corte levado para abate e sobre a possível contaminação das carcaças, dificultando a análise dos fatores de risco aos seres humanos.

Face à escassez de dados nacionais a respeito da *E. coli* O157:H7, às rápidas mudanças que vem ocorrendo principalmente na terminação de bovinos . passando da tradicional terminação a pasto para a terminação confinada, e à necessidade de resultados objetivos que amparem e sustentem a gestão da qualidade, segurança e inocuidade do alimento, realizou-se este trabalho com a finalidade de verificar, além do comportamento dos métodos indicadores, como a contagem total de microrganismos viáveis (CTMV) e de contaminação fecal - coliformes totais e *E. coli*, a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em amostras de fezes de bovinos levados para abate e em carcaças desses mesmos animais, de grupos terminados a pasto e em confinamento, em estabelecimento de abate habilitado à exportação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As próprias operações do processo de abate, principalmente esfolagem e evisceração, são responsáveis pela contaminação superficial das carcaças, seja por microrganismos oportunistas e com potencial deteriorativo ou eventualmente por patógenos. Nesse último caso, embora possam oferecer risco à saúde do consumidor, torna-se impraticável a monitoração de sua ocorrência, tanto pela variedade e diversidade quanto, principalmente, pelo fato de que mesmo quando presentes geralmente o estão em pequeno número e dificilmente se encontram uniformemente espalhados.

Por outro lado, resultados que demonstram a ausência de um patógeno não determinam a segurança de consumo do alimento. Para a maioria dos patógenos não há evidências científicas suficientes que possibilitem a definição de objetivos de segurança do alimento e, portanto, a consequente definição de critérios de aceitabilidade frente à possibilidade objetiva de risco.

Essas constituem as premissas que determinaram a mudança do enfoque no controle da produção de alimentos, vigente até as décadas de 80 e 90, caracterizada por uma prática simplesmente reativa, para a vigente na atualidade, consolidada pela adoção e aplicação do plano APPCC (HACCP) e caracterizada por gestão e práticas preventivas.

O Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) foi desenvolvido para controlar perigos, entre os quais, os microbiológicos, principalmente os microrganismos patogênicos ao ser humano (HOGUE et al., 1998). O APPCC é

utilizado para reduzir o risco de doenças transmissíveis por alimentos através de intervenções em estágios do processamento que apresentem risco plausível de contaminação de carcaça (ELDER et al., 2000). Entretanto, considerando a necessidade de analisar e monitorar esses pontos, a utilização de organismos patogênicos, na prática, é difícil, onerosa e demorada, sendo importante ou mais conveniente, a pesquisa dos indicadores microbiológicos (ICMSF, 1997). Esses indicadores permitem aferir adequadamente o sistema APPCC, como forma de garantir a segurança sanitária do processo de abate (ICMSF, 1997), embora sejam necessários dados microbiológicos e epidemiológicos adequados que permitam obter conclusões seguras sobre a efetividade dos mesmos no controle para patógenos de origem alimentar (ELDER et al., 2000).

Os procedimentos de abate removem a maioria das bactérias presentes na pele e na superfície de carcaças, incluindo alguns patógenos, mas não todos, uma vez que não há a inclusão de um tratamento letal que assegure a eliminação desses microorganismos (NACMCF, 1993).

Apesar da maioria dos microrganismos identificados não apresentar potencial patogênico para humanos, os agentes indicadores ou seus produtos metabólicos são utilizados para avaliar a qualidade microbiológica e a sanidade do produto. A sua presença sugere a ocorrência de contaminação microbiana com possível presença de patógenos ou deterioradores potenciais do alimento, indicando condições sanitárias inadequadas de manipulação, processamento, produção ou armazenamento (ICMSF, 1982).

Assim, os riscos higiênico-sanitários devem, preferencialmente, ser identificados com referência a indicadores genéricos, mas comprovadamente eficazes, como a Contagem Total de microrganismos Viáveis (CTMV) ou ao número de um organismo indicativo de contaminação fecal, como Enterobactérias e *E. coli*, através do exame de amostras de carcaças no processo de abate (HARRIS e STILES, 1992). A presença de *E. coli* nas carcaças implica que outros microorganismos de origem fecal, incluindo *E. coli* O157:H7 e *Salmonella*, podem estar presentes (GRAU, 1986).

2.1. O uso de indicadores higiênico-sanitários em alimentos

Segundo a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1984), os indicadores podem ser agrupados em duas categorias: 1) microrganismos que não oferecem risco direto à saúde, representados pelos mesófilos, psicrófilos, psicrotróficos e termófilos, além de leveduras; e 2) microrganismos que oferecem risco baixo ou indireto à saúde, representados pelos coliformes totais, coliformes fecais (termotolerantes), enterococos, enterobactérias totais e *E. coli*.

A microbiota normal da pele dos bovinos e os microrganismos do solo e fezes constituem os contaminantes das carcaças, dentre os quais fazem parte leveduras, membros das famílias *Bacillaceae*, *Micrococaceae*, *Enterobacteriaceae*, além de *Corynebacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* e *Listeria* sp., sendo as bactérias mesófilas as predominantes (GIL, 2002).

Segundo FRANCO (1996), bactérias aeróbias mesófilas são indicadoras da qualidade sanitária dos alimentos e um número elevado desses microrganismos indica que o alimento é insalubre. Além disso, a contagem elevada desse grupo de bactérias nos alimentos não perecíveis é sugestiva do uso de matéria-prima contaminada ou processamento insatisfatório. Em alimentos perecíveis pode significar abuso durante o armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura. A quantificação da população de microrganismos 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 esola e evisceração (ZWEIFEL & STEPHAN, 2003).

PHILLIPS et al. (2001) analisaram 1.275 amostras de carcaças bovinas em diferentes estabelecimentos e encontraram valores médios de $2,6 \times 10^2$ UFC/cm² para contagem total de mesófilos nas carcaças após a refrigeração. HANSSON (2001), após análise de 200 carcaças bovinas em frigoríficos de alta e baixa capacidade de abate, 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. COLLOBERT et al. (2002),

analisando 233 carcaças bovinas, isolaram mesófilos em populações médias de $6,0 \times 10^3$ UFC/cm².

As análises microbiológicas tradicionais empregadas no controle de qualidade de alimentos foram desenvolvidas no final do século XIX e vêm sendo utilizadas até hoje (SENYK et al., 1987). Muitas são usadas por países importadores para avaliar a qualidade da carne, dentre essas estão incluídas as contagens e determinações do número mais provável (NMP) dos microrganismos indicadores, além de contagens e pesquisa de patógenos (EVANGELISTA, 2001). Porém, esses métodos requerem grande disponibilidade de tempo e excessivo trabalho laboratorial (SILVA et al., 2006).

Há mais de duas décadas, métodos rápidos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de substituir a metodologia tradicional, oferecendo resultados mais rápidos e sensíveis, aumentando a produtividade do laboratório (PRIEGO et al., 2000). Um dos métodos rápidos mais utilizados para detecção de coliformes totais e *E. coli* em alimentos é o Petrifilm EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA). Alguns países como Estados Unidos, Canadá, Austrália, Coreia, Portugal, Noruega, Itália, entre outros, desenvolveram trabalhos e estudos colaborativos para avaliar a eficiência das placas Petrifilm e de outros métodos rápidos em relação aos métodos convencionais (SILVA et al., 2006).

As contagens de coliformes totais e *E. coli* podem estimar falhas na higiene e indicar contaminação de origem fecal, sendo que elevadas contagens destes grupos de microrganismos podem estar relacionadas a níveis significativos de enteropatógenos, como a *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 (JAY, 2000; EISEL et al., 1997; GILL et al., 1996).

Segundo EVANGELISTA (2001), o principal representante dos coliformes fecais é o gênero *Escherichia*. HANSSON (2001) avaliou 200 carcaças bovinas em frigoríficos de alta e baixa capacidade de abate e encontrou 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 microrganismos aeróbios igual ou superior a 10^4 UFC/cm² e *E. coli* excedente a 10^2 UFC/cm².

GILL et al. (1996b) demonstraram que as estimativas das médias aritméticas do log de *E. coli* indicaram um aumento de três vezes na contaminação das superfícies das carcaças após as operações de evisceração e serragem quando comparadas com a etapa de esfolagem das carcaças.

2.2. Caracterização da *Escherichia coli*

E. coli é um membro da família *Enterobacteriaceae*, a qual reúne as bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas e oxidase negativas. Segundo KRIEG & HOLT (1984), as principais características que distinguem essa espécie dos demais membros da família são:

- O metabolismo fermentativo da glicose, que se dá por fermentação ácida mista e resulta em uma quantidade significativa de diferentes ácidos como produtos finais (ácido láctico, acético e fórmico). Essa característica é evidenciada no teste positivo de Vermelho de Metila (VM), que verifica se o pH final do meio de cultura atinge valores abaixo de 4,5. Outra característica importante do metabolismo fermentativo é a capacidade de hidrolisar parte do ácido fórmico produzido, resultando em dióxido de carbono e hidrogênio e a consequente produção de gás.
- As cepas de *E. coli* podem utilizar acetato, glicose, lactose e vários outros compostos como fonte de carbono, mas não utilizam o citrato, característica bastante explorada na identificação da espécie.

- Caracteristicamente, *E. coli* produz indol e a enzima β -glicuronidase, mas não produz sulfeto de hidrogênio e não hidrolisa a uréia. A β -glicuronidase é produzida por 96% das cepas, mas não pelos outros membros da família *Enterobacteriaceae*, exceto *Shigella* (44%) e *Salmonella* (29%). Um dos substratos mais utilizados para verificar a presença da β -glicuronidase é o 4-metilumbeliferil- β -D glicuronídeo (MUG), composto não fluorescente que, quando degradado pela β -glicuronidase, resulta na 4-metilumbeliferona, fluorescente sob luz ultravioleta (UV). O MUG ou seus similares cromogênicos, cujos produtos de reação são coloridos sob luz normal, têm sido amplamente utilizados numa nova geração de meios de cultura para quantificação diferencial de *E. coli* em água e alimentos. O Agar Vermelho Violeta Bile (VRB), contendo um substrato cromogênico da β -glicuronidase, foi utilizado pela 3M Company no desenvolvimento do Petrifilm coliformes/*E. coli*, que permite a quantificação diferencial de *E. coli* e coliformes totais.
- *E. coli*, assim como todos os membros da família *Enterobacteriaceae*, não é uma bactéria esporogênica, logo, não é resistente aos tratamentos térmicos brandos como a pasteurização.

2.3. Classificação de *Escherichia coli* em Sorotipos

A sorotipagem de *E. coli* é baseada nas diferenças antigênicas encontrada em certas estruturas superficiais das células bacterianas. Os três antígenos fundamentais são O, K e H. Os antígenos somáticos $\%O+$ termoestáveis são relacionados com polissacarídeos da membrana externa, os antígenos $\%H+$ termolábeis relacionados com proteínas dos flagelos, enquanto que os antígenos capsulares $\%K+$ termoestáveis são relacionados com polissacarídeos capsulares. Os antígenos de fímbrias formam um quarto sistema de sorotipagem, especificamente para as cepas que apresentam essas estruturas (FRANCO, 2002).

Mais de quatrocentos diferentes sorotipos O:H de EHEC têm sido isolados de bovinos, o que torna seu estudo necessário e importante devido ao envolvimento direto na causa de doenças gastrintestinais humanas (BETTELHEIM et al 2005). No Brasil foram identificados os sorogrupos O11, O113, O114, O119, O125, O126, O128, O142, O158 e O127, com presença de genes de enterotoxinas (RIGOBELLO et al, 2006, VICENTE et al, 2005).

2.4. Classificação de *Escherichia coli* em Patotipos

Atualmente há seis grupos de *E. coli* patogênicas reconhecidos: 1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), 2) *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), 3) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), 4) *E. coli* enteroagregativa (EA_ggEC ou EAEC), 5) *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e 6) *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) (DESMARCHELIER e GRAU, 1997).

A EPEC foi a primeira categoria de *E. coli* identificada como causadora de diarreia. Em 1995, foi reconhecida a existência de duas categorias de EPEC denominadas EPEC típica e EPEC atípica. As características comuns às duas categorias são a não produção de toxina Shiga (Stx) e ambas serem capazes de causar lesão A/E (*attaching and effacing*). (TRABULSI, 2005).

A doença causada por EPEC é uma gastroenterite, caracterizada por diarreia aquosa ou sanguinolenta. O mecanismo da diarreia ainda não está completamente elucidado, mas é decorrente da adesão do microrganismo ao epitélio do intestino e subsequente destruição das microvilosidades, resultando em alteração física da integridade do intestino (PADHYE e DOYLE, 1992).

As ETEC são patotipos de *E. coli* que produzem enterotoxinas termolábeis (LT-I e LT-II) e termoestáveis (STa e STb) (TRABULSI, 2005). A diarreia é consequência da ação de enterotoxinas produzidas por essas bactérias no intestino do indivíduo infectado (SILVA, 2004).

Entende-se por EIEC a classe de *E. coli* que causa uma infecção intestinal muito semelhante à causada por *Shigella*. A infecção é resultante da penetração das

bactérias nas células da mucosa intestinal, e conseqüente penetração nas células adjacentes. Há intensa proliferação dentro dessas células, que leva a sua morte. Não há produção de nenhum tipo de toxina. Como nas shigeloses, a infecção causada por EIEC consiste em inflamação e necrose da mucosa do cólon (intestino grosso). A característica invasiva, tanto da EIEC como da *Shigella*, está associada à presença de um plasmídeo (PADHYE e DOYLE, 1992).

Recebem a denominação *E. coli* enteroagregativa (EAEC) as amostras de *E. coli* agregadas - empilhadas e que formam um padrão agregativo de adesão, quando se associam com células HEp-2 ou HeLa. Esse tipo de bactéria causa lesões que se caracterizam por hiperplasia moderada do íleo e do ceco, edema das vilosidades do intestino delgado e deposição de camadas de bactérias agregadas, empilhadas sobre o epitélio (TRABULSI, 2005).

As cepas de DAEC são definidas pela presença do padrão difusamente aderente no ensaio de aderência em células HEp-2, e causa uma síndrome de diarreia aquosa em adultos e crianças. A patogênese da diarreia causada por DAEC não foi bem elucidada ainda. A maioria das cepas de DAEC expressa uma fímbria de superfície designada F 1845, que pode ser codificada tanto por cromossomo como por plasmídeo (SOUZA, 2006).

As STEC, também chamadas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) ou de *E. coli* verotoxigênicas (VTEC), compreendem uma classe de cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas, incluindo a *E. coli* O157:H7, associada à enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades. A síndrome é decorrente da adesão às células epiteliais intestinais e à ação de citotoxinas produzidas no intestino do indivíduo infectado. No momento, são conhecidas pelo menos duas citotoxinas diferentes, chamadas de verotoxinas (VT I e II) devido ao seu efeito citopático irreversível sobre células Vero (linhagem de células do rim do macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*) (EDUARDO et al., 2002). Também são chamadas de toxinas shiga ou %shiga-like+ toxinas (SLT I e II), devido à semelhança com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo I (WEAGANT et al., 1995).

Entretanto, distinguir as cepas STEC verdadeiramente patogênicas não é simples, uma vez que a mera produção das verotoxinas não é suficiente para conferir virulência, havendo outros fatores envolvidos. Isso teve reflexos sobre a nomenclatura desse grupo, sendo STEC e VTEC termos equivalentes e ambos se referem a todas as cepas de *E. coli* que produzem uma ou mais verotoxinas (NATARO e KAPER, 1998). Como não está claro se a simples presença dos genes que codificam essas toxinas é capaz de conferir patogênicidade, na ausência de outros fatores de virulência, o termo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) fica reservado às cepas que provocam colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urêmica (SHU) ou púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), produzem toxinas shiga, aderem às células do epitélio intestinal provocando lesões A/E (attaching and effacing) e possuem o plasmídeo pO157 associado à produção de enterohemolisinas e potenciais fatores de aderência. Dessa forma, EHEC denota um subgrupo da classe STEC e inclui uma conotação clínica não extensiva a todo o grupo. De acordo com essa definição, todas as cepas EHEC são patogênicas, sendo seu principal representante o sorotipo O157 (EDUARDO et al., 2002; GRIFFIN e TAUXE, 1991; W.H.O., 1998).

2.5. Doenças provocadas pela *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC)

Há atualmente cerca de 200 sorotipos de *E. coli* produtoras de verotoxinas (W.H.O., 1998), responsáveis por um amplo espectro de doenças, que vão desde diarréias brandas à colite hemorrágica e doenças mais graves como a síndrome hemolítico-urêmica e a púrpura trombocitopênica trombótica (EDUARDO et al., 2002).

De acordo com a FDA/CFSAN (2001), a colite hemorrágica provocada pelas cepas STEC é caracterizada por dores abdominais severas e diarréia, inicialmente aquosa e posteriormente sanguinolenta. Ocasionalmente ocorre vômito ou febre baixa. A doença é geralmente autolimitada, durando cerca de 8 dias e, em alguns indivíduos, apresenta apenas diarréia aquosa. A dose infectante é ainda desconhecida, mas de acordo com dados obtidos de surtos parece ser semelhante à da *Shigella* (10 células).

Outras fontes relatam valores na faixa de 10 a 10.000 células por grama ou mililitro do produto consumido (CDC, 1993; LIOR, 1994). A população alvo pode ser de qualquer faixa etária, sendo maiores os riscos para idosos, crianças menores de 5 anos, indivíduos imunodeprimidos ou com problemas renais (WEAGANT et al., 1995).

De acordo com a literatura, cerca de 10% dos casos de colite hemorrágica podem agravar-se, provocando um quadro conhecido como síndrome hemolítico-urêmica (HUS), geralmente diagnosticado de 2 a 14 dias após o início da diarreia. É caracterizado pelo desenvolvimento de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, insuficiência renal aguda e manifestações do sistema nervoso central como letargia, dor de cabeça severa, convulsões e encefalopatia (EDUARDO et al., 2002). A anemia hemolítica decorre de um baixo número de glóbulos vermelhos no sangue, resultante da sua desintegração prematura no interior dos vasos sangüíneos. A hemoglobina não aproveitada é filtrada e expelida pelos rins, deixando a urina escura. Se o volume de destruição for mínimo, o resultado será a letargia; se for aguda, a doença poderá acarretar a morte (ELSTROM, 2001a). A trombocitopenia decorre da redução do número de plaquetas no sangue, causada por distúrbios na sua produção, distribuição ou destruição. Provoca púrpura, que são manchas na pele, ocasionadas pelo sangramento de pequenos vasos sangüíneos (ELSTROM, 2001b; LEHRER, 2001). A insuficiência renal afeta a grande maioria dos pacientes de SHU, cerca de 25% deles apresentando hipertensão arterial e manifestações neurológicas como irritabilidade, letargia, convulsões e coma. Alterações em outros órgãos, como o pâncreas e o coração, também têm sido relatadas com bastante freqüência (EDUARDO et al., 2002).

Púrpura trombocitopênica trombótica é outra complicação extra-intestinal que pode ocorrer nas infecções causadas pelas cepas EHEC. É uma doença mais rara, caracterizada por cinco sinais e sintomas: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, sinais neurológicos, febre e alterações renais. Os sintomas neurológicos podem ser cefaléia, confusão, afasia e alterações da consciência, variando da letargia ao coma (SILVA, 2004).

A Argentina, país de características semelhantes ao Brasil, possui a mais alta incidência de SHU, com aproximadamente 420 novos casos anualmente (RIVERO et al., 2004; RIVAS et al., 2003; BARSLUND et al., 2007; MERCADO, 2007). A síndrome constitui a principal causa de insuficiência renal aguda e a segunda causa de insuficiência renal crônica e de transplante renal no país (BARSLUND et al., 2007). Estudos na década de 90 mostraram evidências de infecção por STEC em 59% dos casos de HUS, sendo a *E. coli* O157 o sorotipo prevalente (RIVAS et al., 2006; ROLDÁN et al., 2007; BARSLUND et al., 2007, SAAD e FRANCO, 1999). *E. coli* O157:H7 tem sido associada a 2 a 18% dos pacientes com síndrome hemolítica urêmica e a 4,5 a 7% das crianças com diarreia sanguinolenta no país (SAAD e FRANCO, 1999). É, também, uma enfermidade relativamente freqüente no Uruguai, com uma incidência anual de 4-5 casos por 100.000 crianças menores de 5 anos (GADEA et al., 2004).

Apesar da proximidade geográfica, ao contrário da Argentina onde a HUS é endêmica, no Brasil as infecções estão restritas a casos esporádicos de diarreia não-sanguinolenta, principalmente em crianças (SALES et al., 2006).

Em 2006, apenas no Estado de São Paulo, foram notificados 617.009 casos de diarreia aguda e, desses, 486 casos de diarreia sanguinolenta, representando 152 surtos e 18 óbitos. Também para o Estado de São Paulo, de 1998 a 2007, foram notificados 89 casos de Síndrome Hemolítica Urêmica, com média de nove casos por ano e letalidade de 40% (35 óbitos). Embora a síndrome não seja provocada exclusivamente pela *E. coli* shigatoxigênica, tais cepas são sua causa de maior impacto. (PRATA et al., 2009)

Dos 12 casos de SHU ocorridos no Estado de São Paulo no período de 1998/2000, com história anterior de diarreia e possível envolvimento com *E. coli* O157:H7, não houve confirmação laboratorial (BERTÃO e SARIDAKIS, 2007). VAZ et al. (2004) analisando uma coleção de 39 cepas de STEC isoladas de pacientes humanos com diarreia no período de 1976 a 1999, em São Paulo, detectou a predominância dos sorogrupos O111 e O26.

2.6. Fatores de virulência da *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)

Os mecanismos pelos quais EHEC causam colite hemorrágica e síndrome hemolítica e urêmica não foram totalmente elucidados. A mais importante característica de virulência, a produção de uma ou mais toxinas Shiga, isoladamente, não é suficiente para causar tais agravos, e outros fatores são considerados relevantes, como a presença do plasmídeo pO157, que codifica a enterohemolisina e a produção de adesinas fimbriais e afimbriais (NATARO & KAPER, 1998; PATON & PATON, 1998).

O principal fator de virulência das EHEC é a produção das toxinas shiga (Stx), extremamente potentes e responsáveis por muitos dos sintomas observados nos pacientes infectados (NATARO & KAPER, 1998). A família Stx apresenta dois grupos principais, imunologicamente distintos e não passíveis de reações cruzadas, chamados de Stx1 e Stx2 (ou VT1 e VT2). Uma cepa EHEC pode expressar apenas a Stx1, apenas a Stx2, ambas ou múltiplas formas da Stx2. Dados epidemiológicos sugerem que a Stx2 é mais importante que a Stx1 no desenvolvimento de HUS (GRIFFIN, 1995). Vários relatos indicam que as cepas de *E. coli* O157:H7 que expressam apenas a Stx2 têm maior probabilidade de provocar HUS do que as que expressam apenas a Stx1 ou, curiosamente, ambas (PICKERING et al., 1994).

As toxinas shiga pertencem ao grupo das toxinas tipo A/B, isto é, apresentam uma subunidade do tipo A, que é enzimática, e 5 subunidades do tipo B, que são oligômeros constituídos de 5 proteínas idênticas (SCHMITT et al., 1999). Essa estrutura básica A/B é comum a todas as toxinas shiga e a Stx1 da EHEC é praticamente idêntica à Stx da *Shigella dysenteriae* I, com algumas cepas apresentando diferença em apenas um resíduo e outras não apresentando qualquer variação na sequência (O'BRIEN et al., 1992; TAKEDA, 1995). Entre si, a Stx1 e Stx2 da EHEC apresentam 55% de homologia na sequência da subunidade A e 57% na sequência da subunidade B (JACKSON et al., 1987).

A subunidade A é responsável pela ação biológica da toxina que clivará o RNA ribossomal, impedindo a síntese protéica na célula do hospedeiro (QUINTANILLA,

2005). As subunidades B mediam a ligação da toxina à célula hospedeira, através de receptores específicos (NATARO & KAPER, 1998).

As Stxs são produzidas pelas bactérias no cólon e chegam até os rins pela corrente sanguínea, danificando as células renais e produzindo uma oclusão da microvasculatura através da combinação da toxicidade e indução da produção local de citocinas e quimiocinas, resultando em uma inflamação local, podendo conduzir a SHU (QUINTANILLA, 2005; ANDREOLI et al, 2002). A Stx também induz apoptose do enterócito (QUINTANILLA, 2005).

As Stxs são interiorizadas nas células humanas via endocitose, resultando em inibição da síntese protéica e morte celular. O dano às células endoteliais do rim, por meio deste processo, é provavelmente o primeiro evento etiológico em SHU. Esse processo pode afetar outros órgãos incluindo o cérebro, miocárdio e pâncreas, com o consequente desenvolvimento de encefalopatia, cardiomiopatia e *diabetes mellitus* (COIA, 1998).

Primeiramente, considerou-se que os bovinos eram refratários aos efeitos tóxicos da Stx devido à ausência de receptores específicos. No entanto, foi constatada a presença desses receptores nas células proliferativas da cripta no intestino dos bovinos. A movimentação intracelular nas células intestinais primárias dos bovinos faz com que a Stx se localize nos lisossomos, ao invés do retículo endoplasmático, o que poderia explicar essa inativação (NAYLOR et al, 2005).

As cepas EHEC são capazes de aderir fortemente às células epiteliais, através da produção de uma proteína superficial denominada intimina e de um receptor . Tirique, uma vez secretado na célula hospedeira, aloja-se na membrana e serve como ponto de ancoragem para a intimina (BASSLER et al., 1995; COMO-SABETTI et al., 1997; FAITH et al., 1996). Esse processo provoca, na célula hospedeira, o que se chama de lesões A/E (attaching and effacing+), causadas pela deformação de algumas microvilosidades, desestruturação de outras e formação de uma estrutura em pedestal, na qual a membrana epitelial envolve a bactéria (SALYERS & WHITT, 1994). Essa lesão é caracterizada pela degeneração localizada das microvilosidades epiteliais intestinais e a montagem de estruturas semelhantes a pedestais, constituídas de

filamentos de actina, formadas nos locais onde há bactérias aderidas (NATARO & KAPER, 1998).

A intimina e o Tir são codificados pelos genes *eae* e *tir*, respectivamente, presentes numa região do DNA chamada LEE (locus of enterocyte effacement) (ALEXANDER et al., 1995). A sequência de aminoácidos das intiminas produzidas pelas diferentes cepas EHEC são altamente divergentes na extremidade carboxílica e, com base nessas variações, são classificadas em 5 subgrupos (, , , , e). Na *E. coli* O 157:H7 ocorre o tipo (GARBER et al., 1995)

Existe uma forte associação entre a produção da intimina e a ocorrência de colite hemorrágica e HUS (PATON & PATON, 1998). Diversos estudos mostram que gene *eae* é muito comum dentre as cepas isoladas de pacientes com essas doenças, mas dentre as cepas isoladas de reservatórios animais, só é frequente nos sorotipos reconhecidos como patógenos (BARRETT et al., 1992; BEUTIN et al., 1995; SANDHU et al., 1996).

As cepas O157:H7 e a maioria dos demais sorotipos da STEC isoladas de humanos apresentam um plasmídeo altamente conservado, chamado pO157 (BEUTIN et al., 1994). Também relatado na literatura como plasmídeo 60-MDa (PATON & PATON, 1998; RIVAS et al., 2000), esse plasmídeo contém o gene *ehxA* (ou *hlyA*), que codifica uma hemolisina, chamada de enterohemolisina ou hemolisina de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC Hly) (RIVAS et al., 2000).

O papel da enterohemolisina ainda é objeto de especulação, podendo estar associado à lise de eritrócitos *in vivo*, liberando heme e hemoglobina (RIVAS et al., 2000). Isso estimularia o crescimento da linhagem O157:H7, porque essas cepas apresentam um sistema de transporte de ferro altamente especializado, que permite utilizar heme e hemoglobina como fonte de ferro (TORRES & PAYNE, 1997).

Outro fator de virulência identificado nos sorotipos O157:H7, O26:H11 e alguns outros EHEC é a presença da EAST-1, enterotoxina termoestável característica da *E. coli* enteroagregativa. A EAST-1 é codificada pelo gene *astA* e um estudo de SAVARINO et al. detectou esse gene em 75 cepas O157:H7 avaliadas (100%). O significado dessa toxina na patogenicidade da EHEC é desconhecido, mas tem-se

sugerido que esteja envolvida com a diarreia aquosa que se observa nos primeiros estágios da infecção (PATON & PATON, 1998)

A adesina Saa também é outro fator de virulência recentemente identificado, detectada em cepas *eae* negativas de STEC. O gene *saa*, que codifica esta adesina, apresenta localização plasmidial. Esse fator de virulência está associado com a adesão da bactéria e, em culturas de células, apresenta um padrão de aderência semi-localizada. Cepas contendo esse gene foram isoladas de pacientes com HUS (PATON et al., 2001) e sua presença está sendo utilizada como um marcador de virulência em testes diagnósticos (PATON & PATON, 2002).

2.7. Bovinos como reservatórios de *Escherichia coli*

O bovino é o principal reservatório de *E. coli* (MERCADO, 2007), eliminando-as por meio de suas fezes, que, de maneira direta ou indireta (RIVERO et al., 2004), podem atingir os seres humanos via cadeia alimentar.

As cepas de *E. coli* compreendem uma vasta proporção da população microbiana intestinal do bovino, acima de 1%, são altamente variáveis e são ainda as de maior número pela estrita população bacteriana anaeróbica. As cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) são raramente as cepas predominantes de *E. coli* encontradas no rúmen ou intestino do bovino (CALLAWAY et al., 2003a), entretanto, há evidências de que a presença STEC O157:H7 nas carcaças de bovinos durante o abate esteja relacionada com a contaminação dessas por fezes.

Uma séria preocupação atual diz respeito à prevalência, nos bovinos, de sorotipos altamente patogênicos para o ser humano, mas aparentemente comensais nessa espécie, configurando-a numa condição de portador são. Não é fácil diagnosticar a presença de bactérias patogênicas em bovinos porque esses patógenos exercem pouco ou nenhum efeito na saúde do animal. No caso da *E. coli* O157:H7 descobriu-se que o ruminante é insensível aos efeitos deletérios das toxinas produzidas por esta bactéria (PRUIMBOOM-BRESS et al, 2000).

Embora isolamentos tenham ocorrido de bezerros com diarreia, esses microorganismos são frequentemente recuperados de animais sadios (VICENTE et al., 2005). Essa situação tem se mostrado preocupante, mormente em função das mudanças alimentares dos bovinos, do manejo e da intensificação da produção.

Rações ricas em grãos estão sendo utilizadas com o intuito de maximizar a eficiência da engorda do gado de corte, pois este tipo de alimento é mais calórico que o feno (HUNTINGTON, 1997). Apesar dessas rações promoverem um maior ganho de peso no animal, estudos têm indicado que a mudança na ingestão de uma dieta rica em fibras para uma dieta rica em grãos pode exercer um efeito marcante na população de *E. coli* em bovinos (CALLAWAY et al, 2003b).

Segundo DIEZ-GONZALEZ et al (2003), gado que ingere principalmente grãos tem o pH do cólon mais baixo e mais *E. coli* ácido-resistentes do que o gado que se alimenta somente de feno.

Em um experimento realizado por JORDAN e MCEWEN (1998), bovinos que recebiam uma dieta altamente concentrada (rica em grãos), passaram a receber uma dieta contendo 50% de milho e 50% de feno de alfafa e, com essa mudança, as contagens de *E. coli* foram reduzidas em 0,3 log em 4 dias.

Os resultados apresentados por BOUKHORS et al (2002) sustentam a hipótese que a ingestão de uma dieta rica em grãos pode induzir mecanismos de ácido-resistência para *E. coli* enterohemorrágica no rúmen, permitindo a sobrevivência desse microorganismo no abomaso. Em seus estudos, CALLAWAY et al (2003a) não somente concordaram com os achados de DIEZ-GONZALEZ (1998), mas afirmaram que a *E. coli* O157:H7 tem o mesmo comportamento.

Entretanto, VAN BRALE et al (2004) constataram em suas pesquisas que bovinos, cujas dietas eram ricas em feno, foram positivos para culturas de *E. coli* O157:H7 por um período mais prolongado e apresentaram um maior número de células desse microorganismo que bovinos cujas dietas eram ricas em grãos.

GRAUKE et al (2003) declararam que a ingestão de feno pelo gado no período anterior ao seu abate é ineficiente para reduzir o número e/ou virulência de *E. coli* O157:H7 no seu trato intestinal.

Segundo DIEZ-GONZALEZ et al (2003), a resistência à acidez parece ser um fator de patogenicidade na transmissão de *E. coli* O157:H7 de bovinos para humanos. Isso porque o pH gástrico humano é ácido e somente as culturas de *E. coli* ácido-resistentes seriam capazes de sobreviver a essa condição ambiental.

A monensina, um ativo antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas, tem sido amplamente utilizada como promotor de crescimento em bovinos de corte. Preocupações têm sido levantadas quanto à utilização de ionóforos enquanto possíveis fornecedores de vantagem competitiva para espécies Gram-negativas, incluindo eventuais patógenos, o que poderia aumentar a contaminação das carcaças pelos mesmos. O uso de monensina como aditivo alimentar na União Européia foi banido em Janeiro de 2006, e extratos de planta foram propostos como alternativas aos antibióticos. Saponinas (WALLACE et al., 1994) e outros componentes de extrato de plantas (MILLER & WOLIN, 2001) reduzem as bactérias Gram-positivas através de vantagem competitiva, mecanismo similar ao da monensina, e novamente há a preocupação com o aumento de bactérias Gram-negativas. Entretanto, DEVANT et al. (2009) demonstraram que tanto a suplementação com monensina quanto com extrato de planta não aumentaram a contaminação das carcaças por *E. coli* O157:H7.

2.8. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7

E. coli O157:H7 é o sorotipo predominante em doenças associadas às *E. coli* enterohemorrágicas e representa uma ameaça à saúde pública, uma vez que seus agravos geralmente são de natureza grave (ROLDÁN et al., 2007). Nos últimos anos, o número de surtos notificados tem aumentado devido às mudanças na produção, processamento e distribuição dos alimentos, nos hábitos de consumo e pela utilização de métodos mais sensíveis para sua detecção. (GOMEZ et al., 2005)

A maioria dos surtos por *E. coli* shigatoxigênicas (STEC) está associada ao consumo de alimentos de origem bovina crus ou mal cozidos. (DOYLE et al., 1995; GOMEZ et al., 2005; RIVERO et al., 2004; SAAD e FRANCO, 1999; ARMSTRONG et

al., 1996; VICENTE et al., 2005). Desde 1982, foram relatados mais de 100 surtos de STEC O157, sendo que 52% foram atribuídos ou relacionados a alimentos de carne bovina (ELDER et al., 2000).

Geograficamente, o foco da atenção sobre a *E. coli* O157:H7 tem sido o continente norte americano (SAAD e FRANCO, 1999). Estima-se que nos Estados Unidos da América ocorram, anualmente, 73.000 casos de infecção por *E. coli* O157:H7, com 2.168 hospitalizações e 61 mortes (CDC, 2006). Outras estimativas situam que as infecções por *E. coli* O157:H7 sejam responsáveis por ao menos 20.000 casos de enfermidades e 250 mortes por ano, com um custo financeiro entre 250 e 500 milhões de dólares (ROLDÁN et al., 2007).

A %marca+ da doença provocada pela *E. coli* O157:H7 em humanos é uma colite hemorrágica freqüentemente auto-limitante. Entretanto, nos surtos relatados, até 25% dos indivíduos infectados necessitaram de hospitalização, 6% desenvolveram sequelas (*life-threatening sequelae*) representadas pela síndrome hemolítica urêmica (HUS), e 1% morreram devido à infecção. Para crianças, a infecção é ainda mais severa, com 5 a 10% progredindo para HUS e a taxa de mortalidade para 3 a 5% (BESSER et al., 1999; GRAUKE et al., 2002). Na América do Norte, pesquisas indicam que *E. coli* O157:H7 é a causa de 85-95% dos casos de síndrome hemolítica urêmica (ARMSTRONG et al., 1996).

A *E. coli* O157:H7 possui uma ampla distribuição nos Estados Unidos, tendo sido encontrada em 63% dos confinamentos. Apesar de ser mais comum em bezerros que em bovinos adultos, é possível que o aumento da concentração de bovinos nos confinamentos tenha gerado um aumento de sua prevalência em animais enviados para abate (ARMSTRONG et al., 1996). Segundo ARTHUR et al. (2009), a elevada ocorrência de *E.coli* O157:H7 em confinamentos decorre da facilidade de disseminação do patógeno entre baias, em curto período de tempo, principalmente quando há animais eliminando alta carga bacteriana, considerados %supershedders+(>10⁴ UFC/g).

Em rebanhos reprodutores, a prevalência foi de 1 a 9,3%, enquanto que para bovinos confinados a prevalência variou entre 2,8% e 35,8% (OMISAKIN, 2003).

ARTHUR et al. (2008) encontraram prevalência de *E. coli* O157:H7 na pele (couro) de bovinos em confinamento de 66% e prevalência fecal de 24,5%.

Ainda nos Estados Unidos, outros dados situam a prevalência de O157:H7 no gado saudável entre 2 a 20% dos animais (BERTÃO e SARIDAKIS, 2007) e, apesar disso, estima-se que menos de 10% dos bovinos excretam esse patógeno nas fezes (NARVÁEZ-BRAVO et al., 2007). Elder et al., examinando gado de corte em frigoríficos, antes e após o abate, puderam isolar *E. coli* O157:H7 em 28% das fezes, 11% na pele e, na carcaça, em 43% antes da evisceração, 18% pós-evisceração e 2% após a lavagem da carcaça, pronta para o resfriamento (BERTÃO e SARIDAKIS, 2007).

De acordo com BOSILEVAC et al. (2009), as taxas de contaminação das carcaças, após a esfolagem, estão diretamente relacionadas com os níveis de contaminação que entram no abatedouro; evidenciando-se que o ambiente dos currais de espera também esteja implicado como contribuinte para a elevada carga de bactérias patogênicas, como a O157:H7, na pele de animais levados para abate (ARTHUR et al., 2008). Estudos mostram variação entre 18,9 e 78,7% na prevalência de *E. coli* O157:H7 na pele de bovinos em abatedouros frigoríficos nos Estados Unidos (KALCHAYANAND et al., 2009; BOSILEVAC et al., 2009).

Estimou-se que 1 a 4% do rebanho britânico levado para abate esteja infectado por *E. coli* O157:H7, entretanto mais recentemente uma prevalência de 8,6% foi encontrada em estudo realizado em propriedades da Escócia (OMISAKIN, 2003).

Em estudo realizado por MEICHTRI et al. (2004), na Argentina, a frequência de detecção de O157:H7 em carcaças bovinas na área de abate foi de 0,5%. No país, a aplicação de técnicas sensíveis de detecção tem permitido estimar que entre 52,2 a 69,0% do rebanho bovino de corte sadio em confinamentos, enviados para abate, excretam STEC. A taxa de isolamento de STEC de bovinos adultos criados a pasto foi de 22% no campo e de 44% no abatedouro (MERCADO, 2007).

Na Venezuela, estudos na cidade de Miranda, mostraram que 1,9% dos bovinos amostrados eram portadores assintomáticos de *E. coli* O157:H7 (NARVÁEZ-BRAVO et al., 2007).

Em criações extensivas, como no Brasil, condições representadas por ambientes contendo fezes, efluentes de esgoto, alimentos e águas contaminados, são frequentemente aventadas como hipóteses da infecção dos animais por agentes de doença (JARDIM et al., 2006). CERQUEIRA et al. (1999) relatam uma grande prevalência (71%) de STEC isolados de amostras de fezes de bovinos sadios, evidenciando que a prevalência em bovinos leiteiros foi maior que em bovinos de corte, 82% e 53% respectivamente. TRISTÃO et al. (2007) identificaram cepas STEC em 65% dos animais analisados no Estado do Rio de Janeiro e 28% no Estado do Rio Grande do Sul, sugerindo que bovinos saudáveis podem ser potenciais fontes de infecção para humanos.

Apesar da alta prevalência de STEC, outros autores brasileiros relatam uma baixa frequência do sorotipo O157:H7. No Estado de São Paulo, IRINO et al. (2005), encontraram 0,6% de *E. coli* O157:H7 nas fezes de bovinos leiteiros jovens. Na região de Ribeirão Preto . SP, STELLA et al. (2008), isolaram *E. coli* em 430 amostras de fezes e, dessas, apenas duas foram confirmadas como O157:H7, configurando-se como isolados de bezerras.

2.9. Detecção de *E. coli* O157:H7 através da reação de polimerase em cadeia (PCR)

De acordo com O'SULLIVAN (1999), a técnica de PCR, na sua forma mais simples, é utilizada para amplificar sequências específicas de DNA em bilhões de vezes, usando uma polimerase termoestável (usualmente *Taq*, a DNA polimerase de *Thermus aquaticus*), deoxinucleotídeos (dNTP) e dois iniciadores, cujas sequências são complementares à sequência alvo. A amplificação é obtida aplicando-se múltiplos ciclos de PCR, geralmente 30 a 40 e, durante cada ciclo, ocorre uma seqüência de reação: aquecimento a aproximadamente 94°C, para desnaturar a fita dupla do DNA; resfriamento a menos de 55°C, para que os iniciadores se tornem híbridos com as

sequências que lhes são complementares nas fitas simples obtidas; e reaquecimento a 72°C, para que a polimerase sintetize a cópia do DNA na região entre os dois iniciadores. Como cada fragmento gerado torna-se o alvo do próximo ciclo de PCR, a amplificação é exponencial e uma simples cópia pode ser potencialmente amplificada.

A especificidade do método na detecção de um microrganismo alvo é baseada na utilização de iniciadores que amplifiquem especificamente sequências características desse microrganismo. No caso da *E. coli* O157:H7 as sequências de vários genes têm sido utilizadas em ensaios de PCR, isoladas ou em combinação, incluindo (NATARO & KAPER, 1998; WANG et al., 2002):

- Genes das toxinas shiga (*stx1*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*)
- Gene da enterohemolisina presente no plasmídeo pO157 (*hlyA*),
- Gene da intimina (*eaeA*)
- Gene que codifica o antígeno somático do sorotipo O157 (*rfbE*),
- Gene que codifica o antígeno flagelar do sorotipo H7 (*fliC*)
- Gene da b-glicuronidase (*uidA*)

O BAX® system da DuPont Qualicon é um dos kits comerciais disponíveis no mercado. É utilizado para detecção de *E. coli* O157:H7 em análise de alimentos, tendo recebido a aprovação AOAC-RI. Performance Tested Method Certificate 010401.

Esse kit utiliza um jogo de iniciadores específicos para *E. coli* O157:H7, selecionadas a partir da análise do genoma de 113 cepas O157:H7 e 176 não-O157:H7. Esse conjunto iniciador amplifica uma sequência de DNA de 530 bp em 99% das cepas O157:H7 e em zero das não-O157. O método tem sensibilidade para detectar 10⁵ UFC/ml de *E. coli* O157:H7 na amostra enriquecida, na presença de uma microbiota acompanhante de até 10⁹ UFC/ml (BARBOUR et al., 1996).

O sistema é todo automatizado e os reagentes acompanham o kit na forma de tabletes, não exigindo qualquer preparação. É requerida uma etapa de enriquecimento, nas condições normalmente utilizadas pelo laboratório, seguida de uma etapa de lise e aplicação da PCR. A grande vantagem do BAX é que os resultados, obtidos em 24

horas, são definitivos e não exigem qualquer etapa subsequente de confirmação (ALEXANDER et al., 1995).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Verificar a ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 associada ao comportamento do indicador geral - contagem total de microrganismos viáveis (CTMV) - e dos indicadores de contaminação fecal - coliformes totais e *E. coli*, em amostras de fezes e de carcaças de bovinos terminados a pasto e em confinamento e abatidos em estabelecimento habilitado à exportação.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar a frequência de *Escherichia coli* O157:H7 em amostras de fezes e de carcaças quentes no momento do abate.
- Comparar a frequência de *Escherichia coli* O157:H7 em bovinos, de mesma faixa etária, terminados a pasto e em confinamento.

- Verificar a frequência de *Escherichia coli* O157:H7 em amostras de recortes cárneos.
- Verificar o comportamento dos resultados do indicador geral . contagem total de microorganismos viáveis (CTMV) - em amostras de carcaças quentes.
- Comparar os resultados das estimativas de microorganismos viáveis em bovinos, de mesma faixa etária, terminados a pasto e em confinamento.
- Verificar o comportamento dos indicadores de contaminação fecal . coliformes totais e *Escherichia coli* - em amostras de carcaças frias.
- Comparar os resultados das estimativas de coliformes totais e de *Escherichia coli* em bovinos, de mesma faixa etária, terminados a pasto e em confinamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização da indústria

A indústria onde foi realizado o trabalho situa-se no município de Barretos, interior do Estado de São Paulo, sendo caracterizada, por suas dependências e instalações, como um abatedouro-frigorífico, segundo estabelece o artigo 21, parágrafo primeiro, do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) . Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997).

Dessa forma, ela é submetida a controle higiênico-sanitário permanente, através do Serviço de Inspeção Federal (SIF), possuindo instalações para o abate, manipulação, preparo e conservação da carne bovina. Seu volume de abate corresponde a aproximadamente mil animais por dia e seus produtos são comercializados a nível nacional e internacional.

4.2. Amostragem

Foram selecionados 100 bovinos machos, clinicamente sadios, 50 provenientes de fazendas com terminação a pasto e 50 de animais de confinamentos. De cada fazenda, aleatoriamente, foram amostrados cinco animais, totalizando 10 propriedades com

sistema extensivo, oito delas localizadas no Estado de São Paulo, uma em Minas Gerais e uma em Goiás; e 10 propriedades com sistema intensivo, nove localizadas no Estado de Minas Gerais e uma em Goiás.

4.3. Colheita das Amostras

Os abates ocorreram entre novembro de 2008 e fevereiro de 2009, sob as mesmas condições. Para a pesquisa de *E. coli* O157:H7, foram colhidas amostras de fezes e de superfície de carcaças quentes. Também foram colhidas amostras de superfície de carcaças quentes para a estimativa da contagem total de microorganismos viáveis (CTMV); de superfície de carcaças resfriadas para estimativas de coliformes totais e de *E. coli*; além da colheita de 67 amostras de recortes cárneos provenientes da desossa de dianteiros e traseiros, em pool da produção, para pesquisa de *E. coli* O157:H7.

Amostras de fezes dos bovinos - Foram colhidas na plataforma de abate, antes do procedimento de oclusão do reto, por meio de suabe retal e acondicionadas em sacos plásticos estéreis, próprios para colheita de amostras, contendo 10 mL de caldo TSB (*Trypic Soy Broth*).

Amostras de superfície de carcaça - Essas amostras foram colhidas seguindo os critérios estabelecidos pelo Regulamento N° 2073/20005 da Comissão Européia, por meio de método não destrutivo, com auxílio de esponja de celulose.

As esponjas estéreis e umedecidas foram esfregadas dez vezes no sentido vertical e dez vezes no sentido horizontal em uma área de 10 cm x 10 cm (100cm²), delimitada por um gabarito metálico em quatro regiões das carcaças frias (pescoço, peito, vazio e região próxima ao lagarto, onde é realizado o procedimento de oclusão do reto durante o abate), e em três regiões nas carcaças quentes (peito, vazio e região próxima ao lagarto) (Figura 1).

Para a pesquisa de *E. coli* O157:H7, as esponjas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis contendo 10 mL de caldo TSB. Já, para a estimativa de contagem total de microorganismos viáveis, de coliformes totais e de *E. coli*, as esponjas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis contendo 10mL de água peptonada tamponada.

Amostras de Recortes Cárneos - Os recortes eram embalados em caixas de 30 kg, sendo que suas peças deveriam ter peso superior a 200g, com 30% do total correspondendo a dianteiros e 70% a traseiros. Durante cada hora da produção foram aleatoriamente selecionadas 5 caixas de recortes, sendo coletados 50g de recortes de cada uma das caixas, correspondendo a uma amostra de 250g. As 67 amostras de 250g de recortes cárneos foram armazenadas em saco plástico estéril.

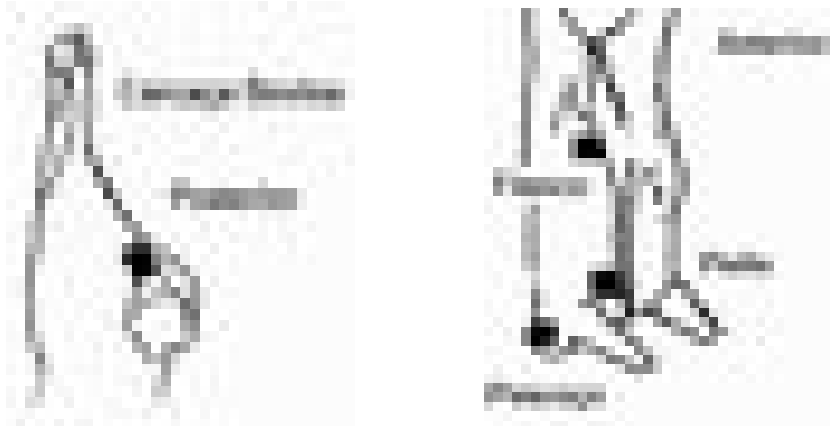


Figura 1. Esquematização de carcaça bovina com identificação dos locais de coleta das amostras.

4.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Preparo das Amostras

Fezes - Às embalagens contendo suabe foram adicionados 90mL de caldo TSB, completando 100mL, além de 1mL de Novobiocina (20mg/L), as quais foram

homogeneizadas em *Stomacher* por um minuto a 200 rotações por minuto (rpm) e levadas à incubação a 41,5°C por 18 a 24h.

Carcaças - Foi utilizado o mesmo procedimento descrito para as amostras de fezes, exceto quanto à adição da Novobiocina.

Recortes Cárneos - Foram retiradas 25g de cada amostra de 250g de recortes cárneos e colocadas em frasco estéril contendo 225mL de caldo TSB. Os frascos foram incubados a 41,5°C por 18 a 24h.

BAX® system da DuPont Qualicon

As amostras de fezes, de carcaças quentes e de recortes cárneos foram submetidas a uma reação de PCR utilizando o *kit* comercial *BAX® system da DuPont Qualicon*.

De cada amostra, após a pré-incubação, foram retiradas alíquotas de 5 L da cultura e adicionadas aos tubos contendo 200 L de lise-protease. Esses tubos foram aquecidos inicialmente por 20min a 37°C e depois por 10min a 95°C. Em seguida foram resfriados em bloco resfriador por cinco minutos, para posterior retirada de alíquota de 50 L e sua transferência para os tubos de PCR alojados numa *rack* e colocados no termociclador, dando início à detecção (DU PONT QUALICON, 2002)

O controle positivo foi realizado utilizando-se cepa de *E. coli* O157:H7, gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz . Fiocruz.

A interpretação dos resultados foi realizada através das curvas de dissociação apresentadas. O perfil da curva positiva para *E. coli* O157:H7 é representado por dois picos alvos a 85 e 88,5°C, variando entre 84 e 90°C e com distância entre si de, aproximadamente, 3,5°C; sendo o primeiro pico menor e mais arredondado e o segundo o dominante. O perfil da curva negativa para *E. coli* O157:H7 não apresenta pico alvo, mas apresenta evidente pico controle.

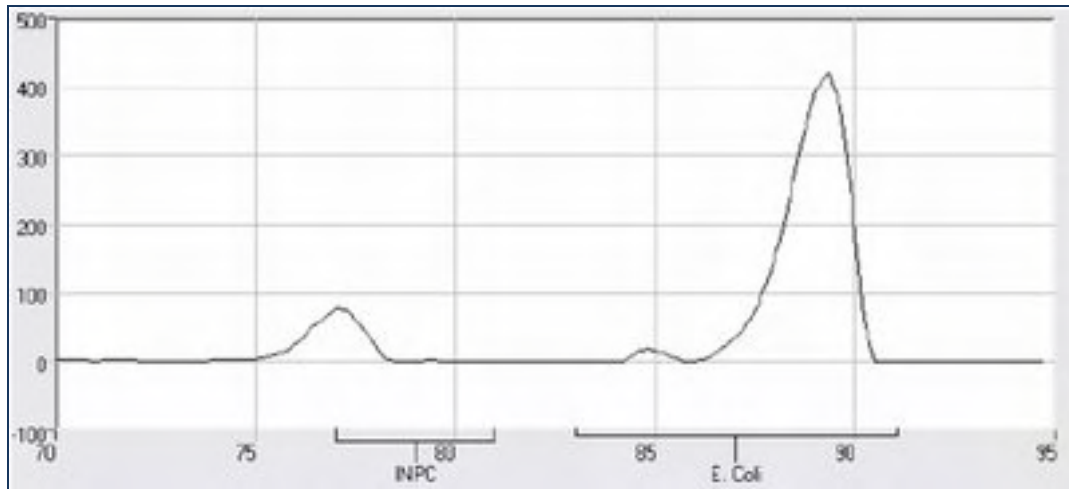


Figura 2. Perfil da curva de dissociação positiva para *E. coli* O157:H7 apresentada pelo teste BAX® system da DuPont Qualicon.

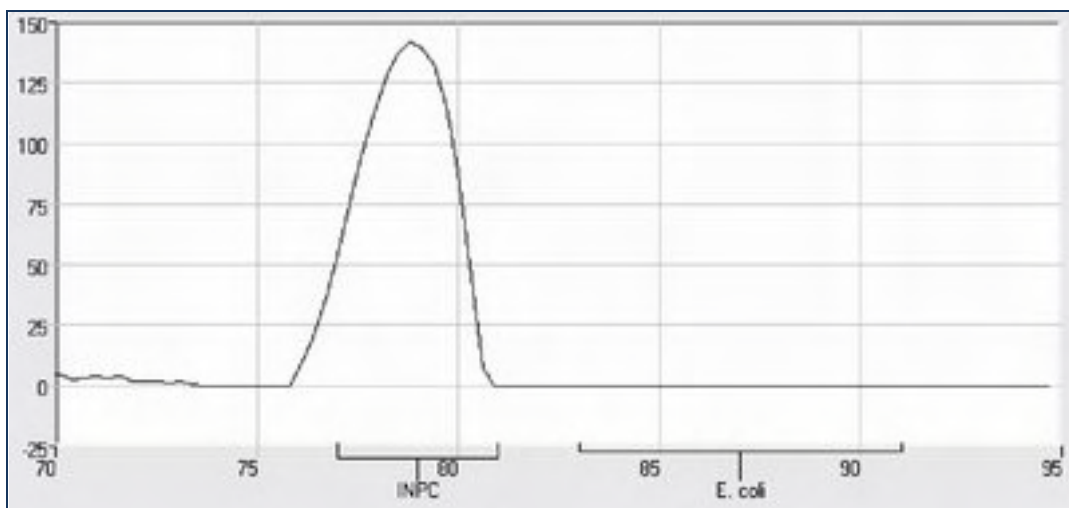


Figura 3. Perfil da curva de dissociação negativa para *E. coli* O157:H7 apresentada pelo teste BAX® system da DuPont Qualicon.

4.5. Análises Microbiológicas E Indicadores

Preparo das Amostras

Às embalagens contendo as esponjas foram adicionados 15mL de água peptonada tamponada, completando 25mL. Foram, então, homogeneizadas em

stomacher por um minuto a 200 rotações por minuto (rpm).

Petrifilm^R PCA e PetrifilmTM *E. coli* Count Plates (ECC)

Baseado nos protocolos ISO 4833:2003 e ISO 21528-2:2004, placas Petrifilm^R PCA e PetrifilmTM *E. coli* Count Plates (ECC) foram utilizadas para estimar a contagem total de microorganismos viáveis e para contagem de coliformes totais e de *E. coli*, respectivamente.

As Placas Petrifilm constituem um sistema de meio de cultura pronto, sendo o Petrifilm^R PCA composto por nutrientes padrões, agente gelificante solúvel em água e um indicador que facilita a contagem das colônias. De maneira semelhante, o PetrifilmTM *E. coli* Count Plates (ECC) é formado por Ágar Vermelho Violeta Bile (VRB), agente gelificante solúvel em água e indicador de atividade de glicuronidase, para a enumeração das colônias.

Segundo AOAC INTERNATIONAL e U.S. FDA - Manual de Bacteriologia Analítica (BAM), os coliformes são bastonetes Gram-negativos, produtores de ácido e gás a partir da lactose durante a fermentação metabólica. Em decorrência da produção de ácido, o pH do indicador diminui e o gel se colore em vermelho escuro. Além dessas características, a *E. coli* produz beta-glicuronidase, detectada pelo indicador que forma um precipitado azul na colônia.

Conforme a AOAC, o volume de 1mL de cada solução contida na embalagem com a amostra foi inoculado na superfície do Petrifilm, seguindo as instruções do fabricante. A seguir, as placas foram incubadas com o lado transparente para cima em estufa a 35°C por 48h. As colônias vermelhas apresentando produção de gás foram contadas como coliformes totais e as colônias azuis com produção de gás como *E. coli*. Os resultados das contagens foram expressos em log₁₀ unidades formadoras de colônia (UFC) por unidade de área (cm²).

4.6. Análise Estatística

Os resultados das contagens de indicadores na superfície da carcaça foram submetidos ao programa estatístico SAS 9.1 (DER e EVERITT, 2001), com aplicação do teste Exato de Fischer para avaliar diferenças entre os grupos com terminação a pasto e em confinamento, com nível de significância $p < 0,05$ (PETRIE e WATSON, 2006). Face ao limite de detecção da análise microbiológica, quando o resultado obtido foi a ausência de coliformes totais ou a ausência de *E. coli*, utilizou-se o valor do \log_{10} 0,8 UFC/cm² para a análise estatística.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nas estimativas da contagem total de microorganismos viáveis, de coliformes totais e de *Escherichia coli* estão apresentados na Tabela 1, na forma de \log_{10} UFC/cm².

Segundo ZWEIFEL & STEPHAN (2003) a quantificação da população de microorganismos viáveis das superfícies das carcaças é comumente utilizada para fornecer dados que indiquem o grau de cuidados higiênico-sanitários durante as operações de abate, particularmente na esfolagem e evisceração. Verificou-se que os resultados da contagem total de microorganismos viáveis nas amostras de bovinos terminados a pasto foram ligeiramente superiores em relação às amostras de bovinos em confinamento (Figuras 4 e 5), embora não haja diferenças significativas entre esses dois grupos. Para animais terminados a pasto os resultados variaram de 2,50 a $6,31 \times 10^2$ UFC/cm², com média de $9,43 \times 10 \pm 2,01 \times 10^2$, enquanto que, para os terminados em confinamento, esses dados variaram de 1,50 a $6,31 \times 10^2$ UFC/cm², com média de $5,26 \times 10 \pm 1,48 \times 10^2$.

JARDIM et al. (2006) obtiveram em todas as etapas das operações de abate avaliadas (antes da esfolagem, após a esfolagem e após a lavagem) resultados das contagens totais de microorganismos viáveis nas amostras de bovinos em pastagens superiores às amostras de bovinos em confinamento, mas diferentemente do presente estudo, com diferença estatisticamente significantes entre as médias.

Tabela 1. Resultados obtidos da avaliação de carcaças para os métodos indicadores de contaminação (contagem total de microorganismos viáveis, coliformes totais e *E. coli*), apresentados em \log_{10} UFC/cm².

Amostra Nº.	Pasto			Confinamento		
	CTMV	Coliformes	<i>E. coli</i>	CTMV	Coliformes	<i>E. coli</i>
1	1,55	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00
2	1,52	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
3	2,80	0,00	0,00	0,57	0,00	0,00
4	0,63	0,00	0,00	1,60	0,00	0,00
5	0,89	0,00	0,00	1,01	0,10	0,41
6	0,86	0,00	0,00	1,13	0,92	0,89
7	1,32	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00
8	1,64	0,00	0,00	1,35	0,00	0,00
9	1,42	0,00	0,00	0,68	0,51	0,32
10	1,21	0,00	0,00	0,78	0,00	0,00
11	1,17	0,00	0,00	0,88	0,00	0,00
12	1,24	0,00	0,00	1,22	0,00	0,00
13	1,01	0,00	0,00	1,19	0,00	0,00
14	1,30	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
15	1,05	1,26	1,10	1,20	1,11	0,63
16	0,98	0,00	0,00	0,90	0,37	0,07
17	1,26	0,00	0,00	1,07	0,69	0,47
18	1,25	0,00	0,00	1,10	0,83	0,40
19	1,39	0,00	0,00	1,18	0,50	0,15
20	1,22	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00
21	1,29	0,00	0,00	0,88	1,74	1,10
22	1,10	0,00	0,00	1,33	1,03	0,00
23	0,72	0,00	0,00	1,09	0,00	0,00
24	0,81	0,00	0,00	1,09	0,62	0,28
25	1,16	0,00	0,00	0,99	1,88	1,10
26	2,80	0,00	0,00	2,80	0,00	0,00
27	2,80	0,00	0,00	1,53	0,00	0,00
28	1,69	0,88	0,10	1,61	0,88	0,00
29	1,25	0,00	0,00	0,60	0,35	0,28
30	1,32	0,00	0,00	1,87	0,52	0,00
31	1,24	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00
32	2,80	0,00	0,00	1,21	0,00	0,00
33	1,20	0,00	0,00	0,51	0,00	0,00
34	2,80	0,82	0,63	0,18	0,00	0,00
35	2,80	0,00	0,00	0,89	0,00	0,00
36	1,75	0,51	0,00	0,80	0,00	0,00
37	1,59	0,00	0,00	0,57	0,07	0,00
38	1,47	0,89	0,65	1,58	0,00	0,00
39	0,94	0,00	0,00	0,99	1,88	1,10
40	1,67	0,12	0,00	0,48	0,00	0,00
41	0,99	0,61	0,00	2,80	0,00	0,00
42	0,51	0,45	0,30	1,53	0,49	0,00
43	0,40	0,00	0,00	2,80	0,00	0,00
44	1,11	0,00	0,00	1,36	0,30	0,00
45	1,35	0,00	0,00	1,67	0,00	0,00
46	1,60	0,00	0,00	0,48	0,00	0,00
47	1,78	0,00	0,24	0,44	1,88	1,10
48	1,01	0,99	0,91	0,89	1,88	1,10
49	1,11	0,00	0,00	1,22	0,88	0,63
50	1,59	0,00	0,00	1,69	0,00	0,00

As médias dos resultados da contagem total de microorganismos viáveis nas amostras de bovinos terminados em pastagens (1,41 log UFC/cm²) e confinados (1,12 log UFC/cm²) foram discretamente menores que os valores encontrados por ZWEIFEL et al. (2004) na Suíça, cujas médias variaram entre 2,1 a 3,1 log UFC/cm²; que o valor de 2,42 log UFC/cm² encontrado por PHILLIPS et al. (2001); e de 1,82 log UFC/cm², encontrado por SUMNER et al. (2003) em abatedouros na Austrália, este último também utilizando Petrifilm. MADDEN et al. (2004) também apresentaram resultados superiores aos encontrados no presente estudo após a lavagem das carcaças, sendo a média de $2,8 \times 10^3$ UFC/cm².

De acordo com GIL (2002), apenas quando o número de microorganismos viáveis na superfície de carcaças de bovinos ultrapassa a 10^5 /cm² se pode afirmar que o abate ocorreu em más condições de higiene. Em função dessa afirmação, FRANÇA FILHO et al. (2006) e COLLOBERT et al. (2002) consideraram como obtidas em boas condições de higiene as carcaças alvo de seus estudos. Esses autores consideraram seus resultados como satisfatórios em relação a outros estudos, indicando que houve boas práticas de higiene durante o abate.

No presente estudo adotou-se critério mais rigoroso que os utilizados pelos autores citados, considerando insatisfatório qualquer valor superior a $2,0 \times 10^4$ UFC/cm². Apesar da grande variação dentro dos grupos de animais a pasto e confinados, como mostram as figuras 4 e 5, todos os valores estão abaixo de $6,3 \times 10^2$ UFC/cm² (log₁₀ 2,8) sendo classificados como satisfatório segundo o critério do *Meat Industry Guidelines* de 2007, da *Food Standards Agency*, Reino Unido. Isso demonstra que as amostras foram obtidas em melhores condições de higiene, sustentando que as boas práticas de fabricação e os programas de qualidade foram executados a contento.

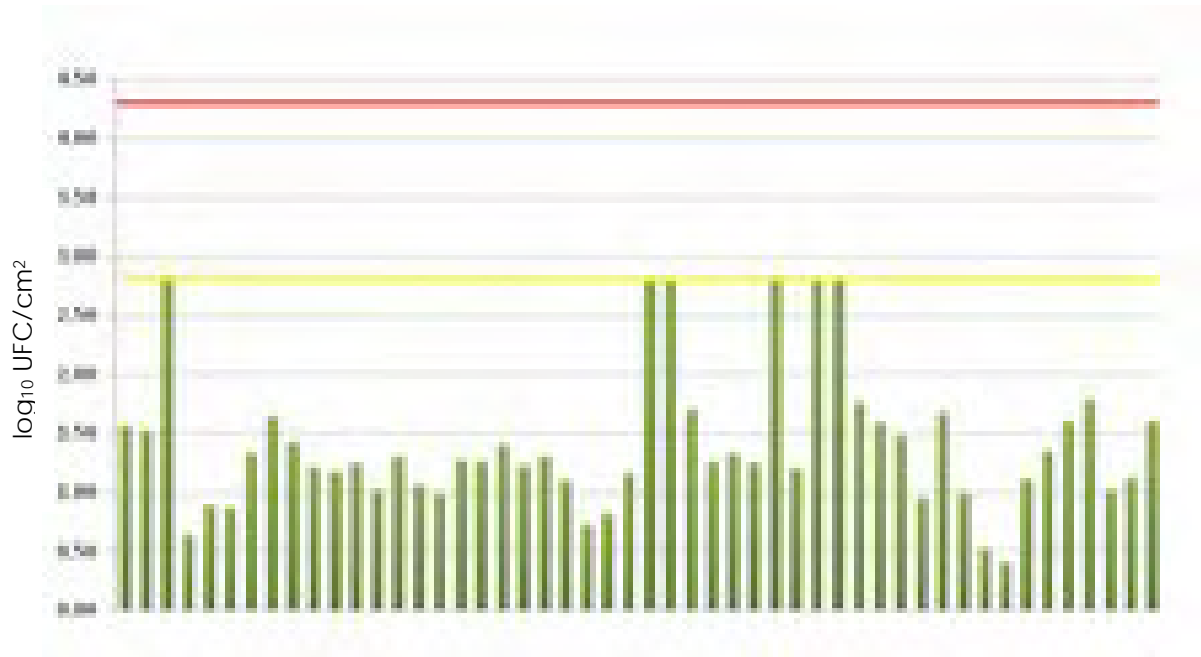


Figura 4: Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça quente de animais a pasto para a contagem total de microorganismos viáveis . log₁₀ UFC/cm². (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória).

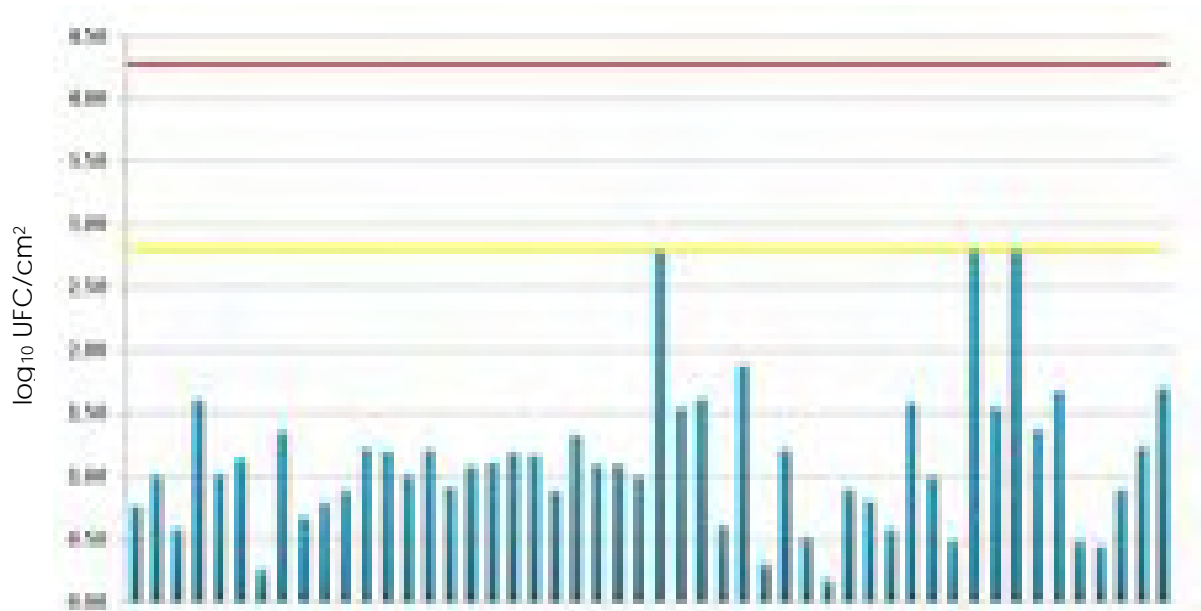


Figura 5: Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça quente de animais confinados para a contagem total de microorganismos viáveis - log₁₀ UFC/cm². (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória).

Para coliformes totais e *E. coli* numericamente ocorreu o oposto à contagem total de microorganismos viáveis, sendo que os animais terminados em confinamento apresentaram valores superiores aos dos animais a pasto (Figuras 6, 7, 8 e 9). As contagens de coliformes totais variaram de 0,08 a $1,81 \times 10$ UFC/cm² e de 0,08 a $7,50 \times 10$ UFC/cm², respectivamente para animais terminados a pasto e em confinamento, com médias de 1,34 UFC/cm² e 9,25 UFC/cm². As contagens de *E. coli* para animais terminados a pasto e para os confinados tiveram a mesma variação de 0,08 a $1,25 \times 10$ UFC/cm², mas com médias de 0,78 e 1,97 UFC/cm², respectivamente.

De acordo com GILL et al, (1996) a contaminação da superfície da carcaça é a base dos problemas, tanto para conservação da qualidade da carne como para a saúde pública. Entre os possíveis microrganismos patogênicos presentes na superfície da carcaça, atenção especial deve ser dada à *Escherichia coli*, por ser considerada como indicadora de contaminação por fezes e da possibilidade da presença de outras bactérias patogênicas. Em alimentos de origem animal, a ocorrência de número elevado de coliformes totais pode indicar manipulação sem cuidados de higiene e/ou armazenamento inadequado (MENDONÇA e GRANADA, 1999).

HANSSON (2001) observou que a grande população de coliformes está relacionada àqueles abatedouros onde não há separação entre áreas suja e limpa, enfatizando que, quando as etapas de abate são realizadas em um mesmo local, há maior probabilidade de contaminação cruzada. Outro fator relacionado refere-se ao pequeno número de funcionários nos estabelecimentos que abatem poucos animais por hora, por conseguinte, uma mesma pessoa realiza diferentes cortes numa mesma carcaça.

No presente estudo, o estabelecimento era de grande capacidade, havia separação entre as áreas suja e limpa e havia número suficiente de funcionários para que cada um desempenhasse apenas uma função.

Diferentemente do estudo de COLLOBERT et al. (2002), que atribuíram os altos valores encontrados para coliformes e *E. coli* às inadequadas práticas higiênico-sanitárias na obtenção da carne, os bons resultados encontrados no presente estudo

permitem admitir que as mencionadas práticas foram devidamente aplicadas durante toda a linha do abate.

RIGOBELLO et al. (2008) avaliou a contaminação por *E. coli* de carcaças bovinas durante as estações de chuva e seca. Na etapa após lavagem, 37 (32%) carcaças amostradas foram *E. coli* positivas e observou-se que o isolamento de *E. coli* foi duas vezes maior (44%) na estação chuvosa quando comparada à estação seca (20%). Este estudo não teve como objetivo comparar o grau de contaminação das carcaças em diferentes estações do ano, mas, particularmente para animais confinados, é de se esperar que, durante a estação chuvosa, os mesmos se encontrem com a pele densamente suja, aumentando o risco de contaminação da carcaça durante o processo de abate. As amostras dos animais confinados foram coletadas durante os meses de novembro e dezembro de 2008 e as dos animais a pasto nos meses de dezembro de 2008 e fevereiro de 2009. Apenas 4% das carcaças de animais a pasto e 10% das carcaças de animais confinados apresentaram isolamento de *E. coli* acima do limite de satisfatório, acreditando-se que esta taxa seria maior se o abate dos animais se realizasse durante a estação chuvosa.

Segundo GRAU (1974), a pele geralmente é considerada a fonte de origem da maioria das contaminações microbiológicas das carcaças. Tanto os animais a pasto quanto os confinados deste estudo, no momento do abate apresentavam-se razoavelmente limpos, o que pode justificar as baixas populações de coliformes totais e *E. coli*, com resultados inferiores aos expostos pelos autores BELL (1997) e JARDIM et al (2006).

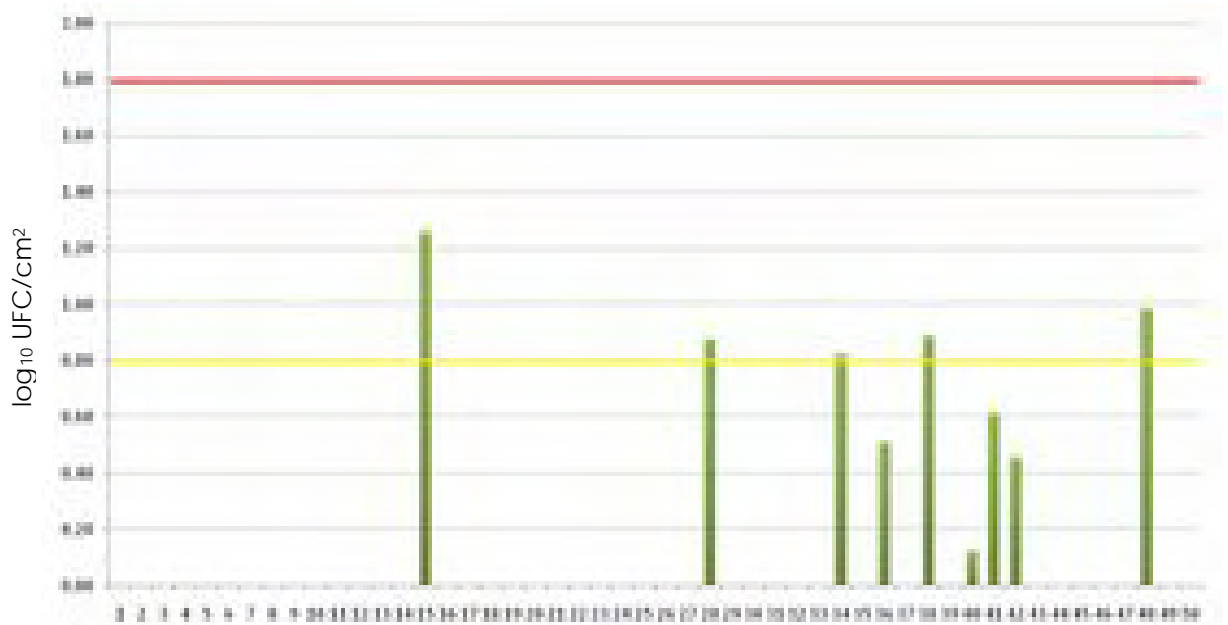


Figura 6: Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça fria de animais a pasto para a contagem de coliformes totais - log₁₀ UFC/cm². (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória).

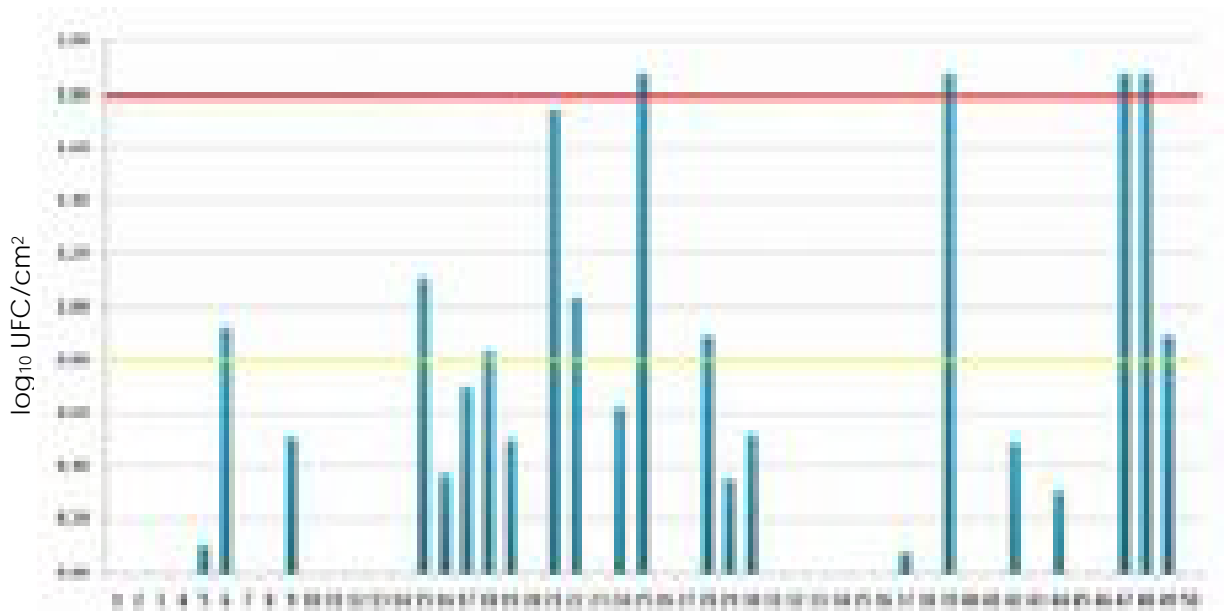


Figura 7: Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça fria de animais confinados para a contagem de coliformes totais - log₁₀ UFC/cm². (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória).

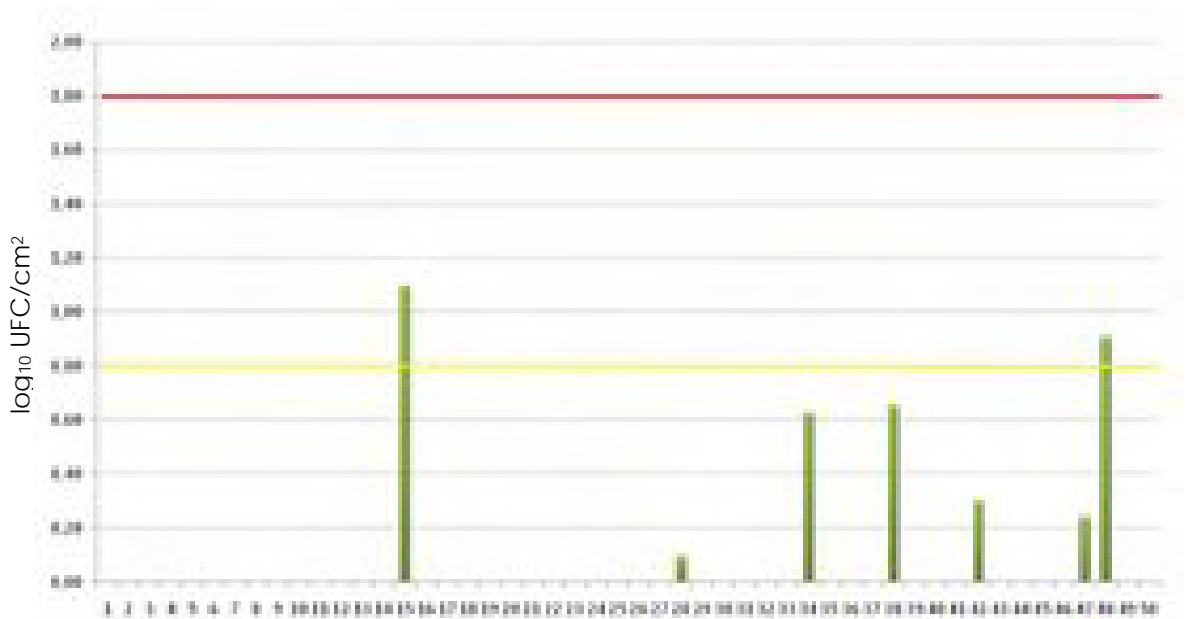


Figura 8: Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça fria de animais a pasto para a contagem de *Escherichia coli* - log₁₀ UFC/cm². (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória).

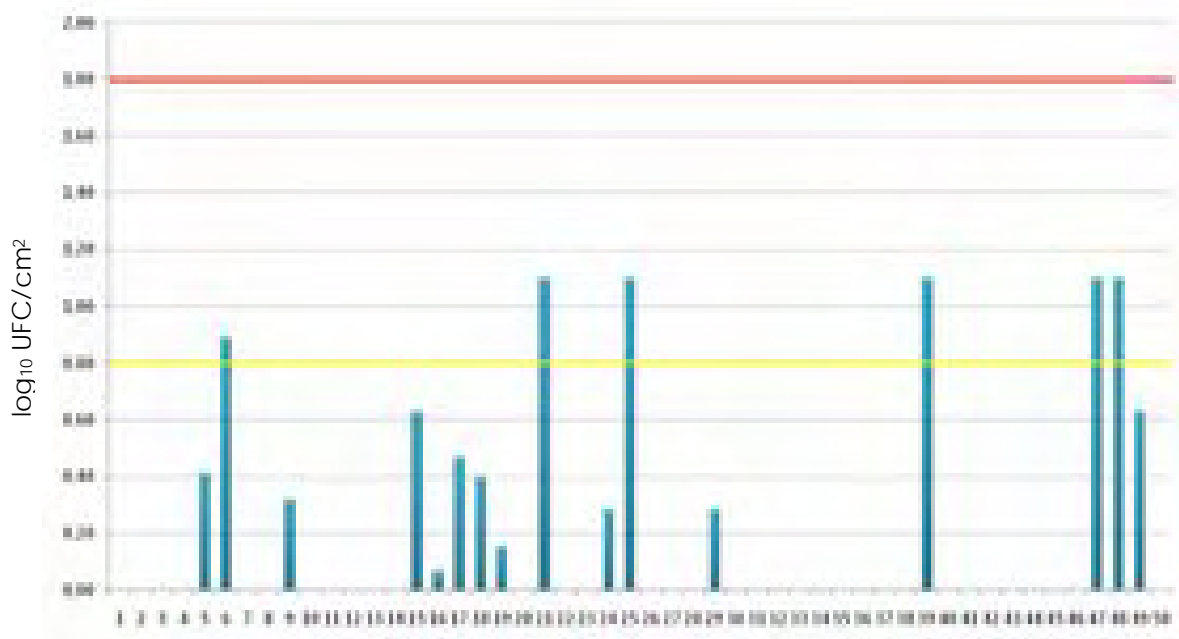
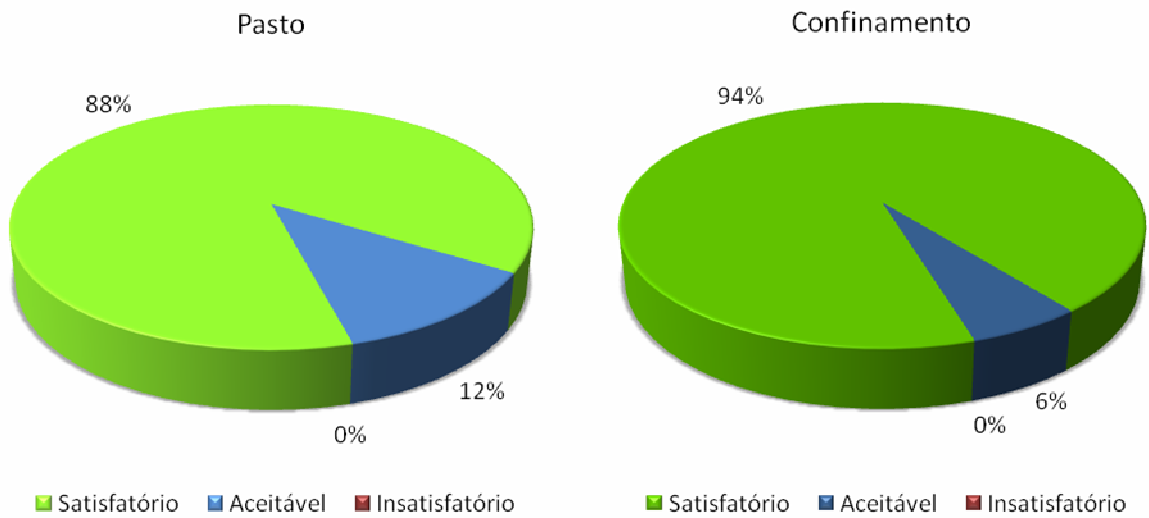


Figura 9: Distribuição dos resultados das amostras de superfície de carcaça fria de animais confinados para a contagem de *Escherichia coli* - log₁₀ UFC/cm². (Linha amarela = limite entre as categorias satisfatória e aceitável; linha vermelha = limite entre as categorias aceitável e insatisfatória).

Este estudo não teve como objetivo comparar as contagens dos microorganismos indicadores, sendo as amostras coletadas apenas após a lavagem das carcaças. Apesar dos autores GILL et al. (1996) e JARDIM et al (2006) relatarem aumento da contaminação nessa etapa, os valores aqui encontrados são comparativamente inferiores, com apenas 15 (15%) e 7 (7%) amostras com valores acima de $6,3 \text{ UFC/cm}^2$ ($0,8 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$) para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente. Desta forma, pode-se julgar que um dos possíveis fatores que contribuíram para as reduzidas populações encontradas esteja no fato de que a indústria, onde foi realizado este estudo, possui controles operacionais e boas práticas que funcionam de forma contínua e organizada, proporcionando um produto seguro com populações de microrganismos em números aceitáveis quanto à higiene de sua obtenção.

Os resultados encontrados na estimativa de contagem total de microorganismos viáveis, de coliformes totais e de *E. coli* foram classificados segundo critérios do *Meat Industry Guidelines* de 2007, da *Food Standards Agency*, Reino Unido. A contagem total de microorganismos viáveis foi considerada satisfatória quando o valor de \log_{10} foi menor que 2,8 ($<6,3 \times 10^2 \text{ UFC/cm}^2$); aceitável entre 2,8 e 4,3 (entre $6,3 \times 10^2$ e $<2,0 \times 10^4 \text{ UFC/cm}^2$) e insatisfatório quando maior que 4,3 ($>2,0 \times 10^4 \text{ UFC/cm}^2$). Já, os parâmetros utilizados para a classificação de coliformes totais e *E. coli*, foram satisfatórios quando o \log_{10} foi menor que 0,8 ($<6,3 \text{ UFC/cm}^2$), aceitável entre 0,8 e 1,8 ($6,3$ e $6,3 \times 10 \text{ UFC/cm}^2$) e insatisfatório quando maior que 1,8 ($>6,3 \times 10 \text{ UFC/cm}^2$). Os limites satisfatórios e insatisfatórios estão representados nas figuras de 2 a 7 através dos traços amarelos e vermelhos, respectivamente.

De acordo com essa classificação, 44 (88%) amostras de animais a pasto foram consideradas satisfatórias e 6 (12%) consideradas aceitáveis para a contagem total de microorganismos viáveis. De maneira pouco superior, 47 (94%) amostras de animais confinados foram consideradas satisfatórias e 3 (6%) aceitáveis (Figura 10). Conforme se verifica nessas ilustrações, nenhum dos dois grupos de animais apresentaram amostras consideradas insatisfatórias para quaisquer dos critérios que poderiam ser utilizados.



10: Percentual dos resultados da contagem total de microorganismos viáveis em amostras de carcaça de animais alimentados a pasto e em confinamento classificadas em satisfatório, aceitável e insatisfatório, de acordo com os critérios do *Meat Industry Guidelines* de 2007, da *Food Standards Agency*, Reino Unido.

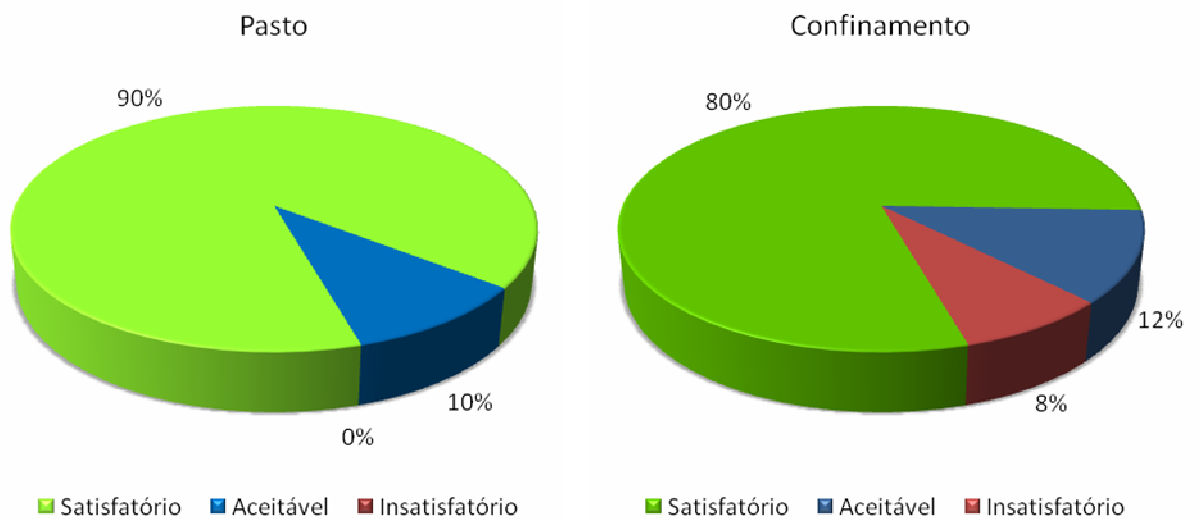


Figura 11: Percentual dos resultados da pesquisa de coliformes totais em amostras de carcaça de animais alimentados a pasto e em confinamento classificadas em satisfatório, aceitável e insatisfatório, de acordo com os critérios do *Meat Industry Guidelines* de 2007, da *Food Standards Agency*, Reino Unido.

Os resultados da contagem de coliformes totais foram considerados satisfatórios em 45 (90%) e 40 (80%) amostras e aceitável em 5 (10%) e 6 (12%) amostras de animais a pasto e confinados, respectivamente, sendo que apenas os animais confinados apresentaram amostras consideradas insatisfatórias, ou seja, quatro amostras (8%) (Figura 11).

Os animais a pasto também apresentaram uma melhor classificação para a contagem de *E. coli*, sendo 48 (96%) amostras consideradas satisfatórias e apenas 2 (4%) aceitáveis; enquanto os animais confinados apresentaram 45 (90%) amostras consideradas satisfatórias e 5 (10%) aceitáveis. Novamente, os dois grupos de animais não apresentaram amostras insatisfatórias (Figura 12).

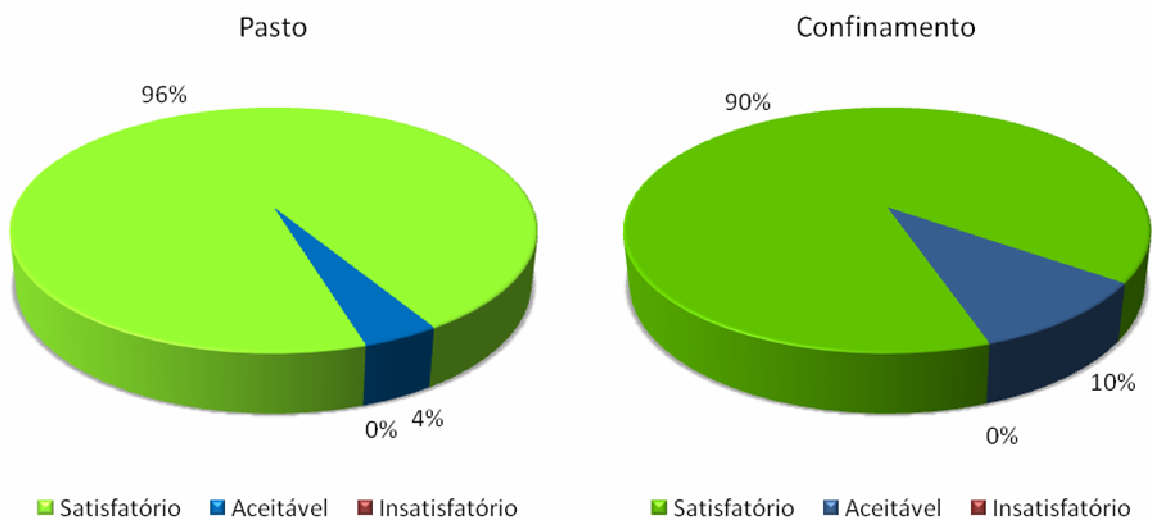


Figura 12: Percentual dos resultados da pesquisa de *Escherichia coli* em amostras de carcaça de animais alimentados a pasto e em confinamento classificadas em satisfatório, aceitável e insatisfatório, de acordo com os critérios do *Meat Industry Guidelines* de 2007, da *Food Standards Agency*, Reino Unido.

O critério do *Meat Industry Guidelines* de 2007, da *Food Standards Agency*, Reino Unido, para classificação de coliformes totais e *E. coli* é mais rigoroso que o estabelecido pela Comissão Europeia, segundo o Regulamento N° 2073 de 2005, que

considera satisfatória média logarítmica menor ou igual a 1,5 log UFC/cm²; aceitável entre 1,5 e 2,5 log UFC/cm² e não satisfatória se ultrapassar 2,5 log UFC/cm². Em 1997, quando o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento iniciou a implantação dos programas APPCC e de Redução de Patógenos, esse último exigido pelos Estados Unidos como tarefa adicional para exportação, o critério para as contagens dos indicadores era ainda mais brando. Segundo o Programa de Redução de Patógenos o desempenho satisfatório para a contagem de *E. coli* é menor ou igual a 100 UFC/cm², o que seria equivalente a 2 log UFC/cm².

O Serviço de Inspeção de Produtos Agropecuários . SIPAG . do Estado de São Paulo, em 2005, avaliou os resultados das contagens de coliformes totais e *E. coli* em cortes de carne bovina *in natura* e os classificou em ideal, tolerável e intolerável. Os resultados das contagens de coliformes totais foram considerados ideais em 92,8%, com valores abaixo de 1.000 UFC/g (<3,0 log₁₀); toleráveis em 3,0% com valores acima de 1.000 UFC/g (>3,0 e <4,0 log₁₀) e intoleráveis em 4,2% com valores acima de 10.000 UFC/g (>4,0 log₁₀). Já os resultados das contagens de *E. coli* foram considerados ideais em 89,2%, com valores abaixo de 10 UFC/g (<1,0 log₁₀); toleráveis em 6,5% com valores acima de 10 UFC/g. e intoleráveis em 4,3% com valores acima de 100 UFC/g (>2,0 log₁₀).

A classificação completa dos resultados obtidos da avaliação de carcaças quentes e carcaças refrigeradas para os métodos indicadores de contaminação está representada na Tabela 2.

Resultados insatisfatórios somente ocorreram na pesquisa de coliformes totais, correspondendo a 4 amostras de confinamento (8,0%), entretanto, mais uma vez não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Pelo teste Exato de Fischer, os valores da contagem total de microorganismos viáveis ($p = 0.4870$), de coliformes totais ($p = 0.1334$) e *E. coli* ($p = 0.4360$) independem do tipo de terminação. Esses resultados estão de acordo com os apresentados por JARDIM et al. (2006) que obtiveram níveis de coliformes totais e de *E. coli*, tanto na pele como nas carcaças, muito semelhantes entre animais a pasto e confinados.

Tabela 2. Classificação dos resultados obtidos da avaliação de carcaças quentes e carcaças refrigeradas para os métodos indicadores de contaminação (contagem total de microorganismos viáveis, coliformes totais e *E. coli*), interpretados de acordo com critérios recomendados para as indústrias de carne (*Food Standards Agency*, 2007). Barretos, SP. Brasil.

Terminação		Confinamento		Pasto	
Número de Amostras		50		50	
CTMV	Satisfatório	47	94%	44	88%
	Aceitável	3	6%	6	12%
	Insatisfatório	0	0%	0	0%
Coliformes Totais	Satisfatório	40	80%	45	90%
	Aceitável	6	12%	5	10%
	Insatisfatório	4	8%	0	0%
<i>E. coli</i>	Satisfatório	45	90%	48	96%
	Aceitável	5	10%	2	4%
	Insatisfatório	0	0%	0	0%

O Regulamento N° 471/2001 expõe a decisão da União Européia de indicar método não destrutivo com auxílio de esponja de celulose para a colheita das amostras de superfícies de carcaça. Devido a este regulamento, optou-se por utilizar esse método no presente trabalho, o que se mostrou uma decisão acertada, uma vez que confere agilidade e padroniza essa etapa para as estimativas microbiológicas. O uso de Petrifilm também se mostrou prático e adequado para a enumeração de microorganismos viáveis, coliformes totais e *E. coli*. Segundo SILVA et al. (2006) o Petrifilm EC mostrou-se mais sensível e eficaz na detecção de *E. coli* em relação ao método de tubos múltiplos, o qual apresentou resultados falso-negativos ou contagens subestimadas de *E. coli*, dados esses obtidos em amostras de alimentos de origem animal.

Os resultados encontrados na pesquisa de *E. coli* O157:H7 foram todos negativos, exceto por uma amostra de recorte cárneo (Tabela 3 e Figura 11). Esses dados são compatíveis com os resultados encontrados para os indicadores - contagem

total de microorganismos viáveis, de coliformes totais e *E. coli*, considerados aceitáveis em 91%, 85% e 93% das amostras, respectivamente.

Tabela 3. Resultados e respectiva frequência da ocorrência para a pesquisa de *E. coli* O157:H7 em amostras de carcaças, de suabe retal e de recortes da desossa durante o abate de bovinos terminados a pasto e em confinamento. Barretos, SP. Brasil.

Amostragem	Terminação	Número de amostras	Resultados Positivos	Frequência da ocorrência %
Carcaças	Pasto	50	0	0
	Confinamento	50	0	0
Fezes	Pasto	50	0	0
	Confinamento	50	0	0
Recortes	Ambos	67	1	1,49
Total		267	1	0,37

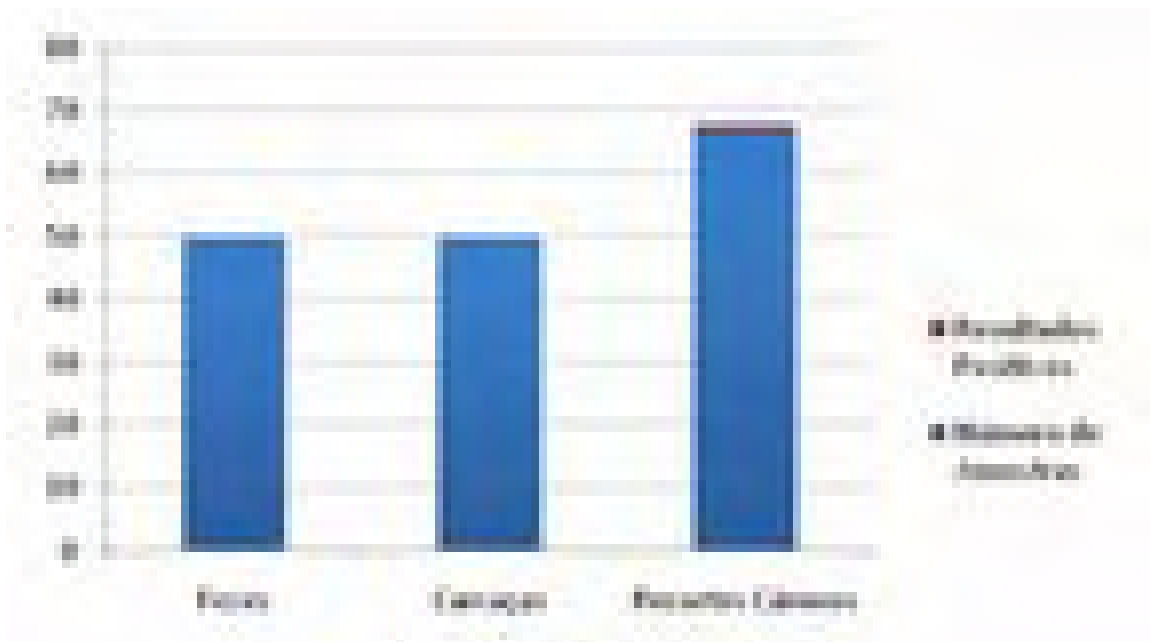


Figura 13: Resultados da pesquisa de *E. coli* O157:H7 em amostras de suabe retal, de carcaças e de recortes da desossa durante o abate de bovinos. Barretos, SP. Brasil.

Tradicionalmente, o Brasil é caracterizado como um país produtor de gado de corte. Os animais são alimentados principalmente em pastagens, considerando que evoluíram como herbívoros pastejadores. No entanto, devido a uma taxa mais rápida de fermentação que das fibras, os grãos de cereais podem ser um valioso suplemento para a produção de bovino de corte. Vários estudos sugerem que a alimentação contínua com dieta de elevado teor de grãos promove a proliferação da população de *E. coli*, diminui o pH do conteúdo ruminal e seleciona cepas STEC ácido-resistentes, aumentando a eliminação de *E. coli* enterohemorrágica, dentre elas a *E. coli* O157:H7. Essas condições, aliadas à alta densidade animal em confinamentos, como ocorre tradicionalmente nos Estados Unidos, torna razoável supor que a seleção de sorotipos de *E. coli* ácido-resistentes em bovinos alimentados com grãos difere daquela isolada de animais a pasto, tanto em número como em sorotipos (RIGOBELLO et al., 2008).

Entretanto, outros autores aventam como hipótese da infecção dos animais por agentes de doenças as criações extensivas, como no Brasil, representadas por ambientes contendo fezes, efluentes de esgoto, alimentos e águas contaminados (JARDIM et al. 2006). De acordo com BOSILEVAC et al. (2009), as taxas de contaminação das carcaças após a remoção da pele estão diretamente relacionadas com os níveis de contaminação que entram no abatedouro.

O presente estudo teve como objetivo comparar a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em amostras de fezes e de carcaças de animais provenientes de criação a pasto e em confinamento, visando auxiliar a compreensão dessas duas teorias, mas os dois grupos não apresentaram amostras positivas para esse patógeno.

O ambiente dos currais de espera dos abatedouros também tem sido implicado como contribuinte para a elevada carga de bactérias patogênicas na pele de animais apresentados para abate (ARTHUR et al., 2008). Bactérias marcadas têm sido utilizadas para demonstrar o potencial de difusão de patógenos entre lotes de bovinos nos currais dos abatedouros (CUESTA ALONZO et al., 2007). Outros estudos demonstraram que os pisos dos currais podem albergar *E. coli* O157:H7 de um dia para o outro, mesmo depois dos processos de limpeza de rotina terem sido realizados (SMALL et al., 2006; TUTENEL et al., 2003).

KALCHAYANAND et al. (2009) encontraram prevalência de *E. coli* O157:H7 na pele de bovinos em 77,5% em abatedouro frigorífico nos Estados Unidos. BOSILEVAC et al. (2009) encontraram prevalência próxima a esse valor, 70,9%, na pele de bovinos em estabelecimentos de abate com capacidade diária menores que mil animais por dia.

ARTHUR et al. (2008) encontraram prevalência de *E. coli* O157:H7 na pele de bovinos em confinamento de 66% e prevalência fecal de 24,5%. Entretanto, apresentaram que acima de 65% dos isolados de *E. coli* O157:H7 da pele dos animais e 83% dos isolados de carcaças coletados em abatedouro de bovinos não originaram do confinamento de onde os animais eram provenientes. Os mesmos autores encontraram *E. coli* O157:H7 em 9 (64%) dos 14 caminhões utilizados para o transporte dos animais antes do embarque dos mesmos.

Está estabelecido que no momento do abate, a pele é a principal fonte de contaminação das carcaças bovinas por *E. coli* O157:H7 (ARTHUR et al., 2009). Portanto, uma importante ação é reduzir os níveis de patógenos na pele dos animais, através de medidas como uso de banho de aspersão antes do abate. Em estudo de ARTHUR et al. (2008), a prevalência e as contagens de *E. coli* O157:H7 foram menores nas plantas processadoras que utilizam cabines para limpeza da pele quando comparadas com plantas sem essas cabines.

O frigorífico onde foi realizado o experimento, além de adotar os procedimentos exigidos pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA), por estar habilitado à exportação para União Européia e Estados Unidos, também cumpre as exigências desses países. Todos os caminhões são lavados e desinfetados com solução de hidróxido de sódio a 2%, conforme instrução da Organização Internacional de Epizootias, antes saírem do frigorífico para o embarque dos animais.

Os currais dos frigoríficos são planejados e construídos visando garantir não apenas o bem-estar dos animais, mas também a sanidade e a biossegurança, com pavimentação adequada, de fácil higienização e declive de 2% em direção a canaletas coletoras; rede de esgoto e instalações adequadas para o recebimento e tratamento de resíduos orgânicos; cercas com 2m de altura e cordão sanitário entre os currais, em

alvenaria, com no mínimo 30cm de altura. Essas exigências facilitam a limpeza, permitem que os dejetos escoem mais facilmente e que não haja troca de resíduos entre um curral e outro, diminuindo a sujidade do pavimento e, conseqüentemente, da pele dos animais, visando a redução da contaminação por bactérias, incluindo patógenos como a *E. coli* O157:H7.

Os animais permanecem nos currais do frigorífico sem mistura de lotes oriundos de diferentes propriedades. De acordo com o RISPOA, Art.110, é proibida a matança de qualquer animal que não tenha permanecido pelo menos 24 horas em descanso, jejum e dieta hídrica, sendo o período mínimo de repouso nos depósitos do estabelecimento frigorífico de seis horas. Esse período de descanso e jejum é importante para restabelecer as reservas de glicogênio muscular, que é consumido durante o manejo desde a fazenda até o frigorífico, e para a redução do conteúdo gastrintestinal visando facilitar a evisceração da carcaça e diminuir o risco de contaminação da mesma.

Uma prática comum em países de clima frio, mas não usual no Brasil devido ao clima, à dificuldade operacional e por ser onerosa, é o emprego de cama nos currais para maior conforto aos animais, sendo utilizada palha ou serragem. Essa cama facilita a retenção dos dejetos e a contaminação da pele quando os animais se deitam. Também dificulta a limpeza e higienização dos currais, sendo necessária a remoção e queima de toda a palha entre um lote de animais e outro.

A diferença de clima também é um importante fator a ser considerado para os animais de confinamento. Em países da Europa e nos Estados Unidos os animais permanecem confinados por longos períodos, por vezes desde a desmama até o abate, como no estudo de ARTHUR et al. (2009), enquanto no Brasil, o tempo médio de permanência dos animais em confinamento é de cem dias, sendo apenas para terminação. Geralmente esse período de confinamento se dá entre os meses de agosto e dezembro, propositadamente devido à estação de seca. Em decorrência dessas condições, no Brasil, mesmo os animais confinados quando levados para abate se apresentam limpos quando comparados à Classificação de Limpeza Corporal do *Red Meat Safety & Clean Livestock . Food Standards Agency (2002)*, com maior

concentração de sujidades apenas nas patas (Figuras 14 e 15), e, portanto, com menor contaminação da pele por dejetos.

Nos currais do frigorífico também são utilizados aspersores de água (Figura 16) para garantir bem-estar aos animais, umedecer as sujidades aderidas à pele e facilitar sua remoção, como também facilitar a limpeza das instalações. Aparentemente a remoção de sujidade da pele é bem sucedida, provavelmente em função da pelagem curta da maioria dos animais abatidos. Esse é outro motivo de preocupação, pois em função da qualidade da carne, precocidade de carcaça e expansão da terminação confinada, observa-se frequência crescente de animais cruzados (zebuínos x raças européias) modificando tal característica.

Antes da entrada da seringa que leva os animais para o box de atordoamento, obrigatoriamente há um sistema tubular de chuveiros dispostos longitudinal e lateralmente com água hiperclorada 5 ppm e 3 ATM de pressão, onde os animais permanecem para um banho de aspersão (Figura 17) cuja finalidade é de contribuir com a limpeza da pele e assegurar uma esfolia higiênica, como demonstrou o estudo de ARTHUR et al. (2008).



Figura 14: Lote de animais terminados a pasto durante o jejum de pré abate nos currais da indústria.



Figura 15: Lote de animais terminados em confinamento durante o jejum de pré abate nos currais da indústria.



Figura 16: Curral de pré abate com utilização de aspersores de água.



Figura 17: Banho de aspersão imediatamente à saída dos currais pré abate (água hiperclorada e pressão mínima de 3 ATM).

Todos esses procedimentos visam garantir uma melhor condição higiênico-sanitária dos animais no momento do abate e das operações que o seguem. No presente estudo, as baixas contagens dos microrganismos indicadores e a não detecção de *E. coli* O157:H7 nas carcaças de bovinos terminadas tanto a pasto como em confinamento, demonstram que esses procedimentos têm se mostrado eficazes. Vale ressaltar que, dentro dos programas de boas práticas e de redução de patógenos, a monitoração é sistemática e sempre que ocorre um desvio imediatamente ocorre a tomada de medidas corretivas. Por outro lado, a não detecção de *E. coli* O157:H7 também nas amostras de fezes desses animais permite supor que haja uma baixa ocorrência desse sorotipo no Brasil.

A não detecção de *E. coli* O157:H7 como contaminante na carcaça, neste estudo, contrasta com o elevado número de cepas detectadas nas fezes diarréicas ou de animais saudáveis no Brasil (IRINO et al., 2005; RIGOBELLO et al. 2006; RIGOBELLO et al. 2008). SALES et al. (2006), analisaram 100 amostras fecais de bovinos abatidos em São Luís, Maranhão, sendo que a taxa de isolamento de STEC foi de 73%. VICENTE et al. (2005) encontraram taxa ainda maior, com cepas STEC identificadas em todos os rebanhos analisados em Jaboticabal . SP, sendo os sorogrupos O157, O111 e O113 observados em 40%, 50% e 90% das amostras. Isso poderia sugerir um trabalho eficaz durante a remoção da pele ou do trato gastrointestinal durante abate.

A frequência de O157:H7 de 0,37% é próxima aos valores encontrados em estudos realizados em carcaças bovinas na área de abate, como de 0,5% encontrado por MEICHTRI et al. (2004), na Argentina, de 0,1% encontrado por PHILLIPS et al. (2004) na Austrália, e 1,5% obtido por CERQUEIRA et al. (1999) no Estado do Rio de Janeiro.

ROLDÁN et al. (2007), isolou *E. coli* O157:H7 em 1,2% de 250 amostras de recortes cárneos, porcentagem próxima à encontrada no presente trabalho, de 1,49%.

Apesar de todas as amostras fecais apresentarem resultados negativos na pesquisa de *E. coli* O157:H7 outros autores brasileiros também relatam uma baixa prevalência desse sorotipo. No Estado de São Paulo, IRINO et al. (2005), encontraram 0,6% de *E. coli* O157:H7 nas fezes de bovinos leiteiros jovens. Na região de Ribeirão

Preto . SP, STELLA et al. (2008), isolaram *E. coli* em 430 amostras de fezes e, dessas, duas foram confirmadas como O157:H7, configurando-se como isolados de bezerros.

A variação nas frequências de *E. coli* O157:H7 pode, em parte, ser decorrente de diferentes técnicas utilizadas (ARMSTRONG et al., 1996). O método utilizado neste estudo, o sistema BAX®, possui correlação direta maior que 99% com mais de 120 tipos de *E. coli* O157:H7, e demonstra excelente exclusão (>98%) contra outros tipos de *E. coli* e outras bactérias entéricas, condições essas aferidas por meio de controles positivos e negativos (DU PONT QUALICON, 2002).

Aliando baixas frequências de *E. coli* e, conseqüentemente, de *E. coli* O157:H7, com práticas higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação adequadamente realizadas no frigorífico onde o estudo foi realizado, tais evidências sustentam os resultados obtidos.

6. CONCLUSÕES

- Constatou-se que as estimativas de microorganismos viáveis situaram-se abaixo das expectativas, sendo que a média foi de 73,40 UFC/cm².
- Não foram constatadas diferenças significativas das contagens de microorganismos viáveis entre os tipos de terminação, os quais evidenciaram médias e variações semelhantes.
- As contagens de coliformes totais apresentaram médias de 1,34 UFC/cm² e 9,25 UFC/cm² (ambas menores que 10) respectivamente para animais terminados a pasto e em confinamento, com variações de 0,08 a 7,50x10 UFC/cm².
- As contagens de *E. coli* tiveram variação de 0,08 a 1,25x10 UFC/cm² e médias de 0,78 e 1,97 UFC/cm² para animais terminados a pasto e para os confinados, respectivamente.
- De maneira semelhante à contagem de microorganismos viáveis, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos de animais a pasto e confinados para as estimativas de coliformes e *E. coli*.
- Demonstrou-se que a ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 durante o abate foi baixa, não sendo encontradas amostras positivas tanto nas amostras de fezes como de carcaças.
- Dentre as amostras de recortes cárneos, apenas uma apresentou-se como positiva para *Escherichia coli* O157:H7, com frequência de 1,49%.

- Do total, 91%, 85% e 93% dos resultados das contagens microorganismos viáveis, de coliformes totais e de *E. coli* foram classificados como satisfatórios, sem diferenças significativas entre os tipos de terminação. Esses resultados suportam a não detecção de *E. coli* O157:H7 nas amostras de fezes e de carcaças de bovinos.

7. REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/>. Acesso em : 03 dez 2009.

ALEXANDER, E. R.; BOASE, J.; DAVIS, M. et al. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami-Washington and California, 1994. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 44, n. 9, p. 157-160, 1995.

ANDREOLI, S. P.; TRACHTMAN, H.; ACHESON, D. W.; SIEGLER, R. L.; OGRIG, T. G. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology and therapy. **Pediatric Nephrology**, v .17, n. 4, p. 293-298, 2002.

AOAC. **Method 991.14**: Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg: AOAC International, p. 22-23, 2000.

ARMSTRONG, G.L. et al. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, v.18, n.1, p.29-51, 1996.

ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M. et al. Source tracking of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* contamination in the lairage environment at commercial U.S. beef

processing plants and identification of an effective intervention. **Journal of Food Protection**, v.71, n.9, p. 1752-1760, 2008.

ARTHUR, T.M.; KEEN, J.E.; BOSILEVAC, J.M. et al. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in a beef cattle feedlot and role of high-level shedders in hide contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.20, p. 6515-6523, 2009

BARBOUR, W. M.; ECRET, L. D.; JENSEN, M. A. et al. A PCR-based method for the detection of E. coli O157:H7 from ground beef. In: THE 96th GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 1996. **Anais**. Washington: American Society for Microbiology, 1996. p.396.

BARRETT, T. J.; KAPER, J. B.; JERSE, A. E.; WACHSMUTH, I.K. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. **Journal of Infectious Diseases**, v. 165, p. 979-980, 1992.

BARSLUND, S.A. et al. Síndrome Uremico Hemolítico. **Revista de Pós-graduação de la Vía Cátedra de Medicina**, n.170, p.16-20, 2007.

BASSLER, H. A.; FLOOD, S. J.; LIVAK, K. J. et al. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3724-3728, 1995.

BELL, R.G. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. **Journal of Applied microbiology**, v.82, p.292-300, 1997.

BERTÃO, A.M.S.; SARIDAKIS, H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.28, n.2, p.81-92, 2007.

BESSER, T. E. et al. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. **Journal of Infectious Diseases**, v.175, p.726-729, 1997.

BETTELHEIM, K.A. et al. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p. 699-709, 2005.

BEUTIN, L.; ALEKSIC, S.; ZIMMERMANN, S.; GEIER, K. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 183, p. 13-21, 1994.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S.; KARCH, H. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 631-635, 1995.

BOSILEVAC, J.M.; ARTHUR, T.M; BONO, J.L. et al. 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, 2009.

BOUKHORS, K. et al. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (STEC) growth and survival in rumen and abomasums fluids. **Veterinary Research**, v.33, p. 405-412, 2002.

CALLAWAY, T.R. et al. Forage feeding to reduce preharvest *Escherichia coli* populations in cattle, a Review. **Journal of Dairy Science**, v.82, p. 93-99, 2003b.

CALLAWAY, T.R. et al. What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? **Food and Feed safety Research Unity**, v.86, p.93-99, 2003a.

CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States,1992-1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 42, p. 258- 263, 1993.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g.htm. Acesso em 24 nov 2007.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/stec_gi.html. Acesso em 24 jan 2008.

CERQUEIRA, A.M. et al. High occurrence of shiga-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, n.70, p.111-121, 1999.

CHINEN, I. et al. Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from calves in Argentina. **Res. Vet. Science**, n.74, p.283-286, 2003.

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.

COMO-SABETTI, K.; REAGAN, S.; ALLAIRE, S. et al. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts - Michigan and Virginia, June-July 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 46, p. 741-744, 1997.

CUESTA ALONZO, E.P.; GILLILAND, S.E.; KREHBIEL, C.R. Incidence and toxin production ability of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from cattle trucks. **Journal of Food Protection**, v.70, p. 2383-2385, 2007.

DER, G.; EVERITT, B.S. **A Handbook of Statistical Analyses using SAS**. Charpman & Hall, 2001. 376p.

DESMARCHELIER, P.M.; GRAU, F.H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A. D.; ARNOLD, G.; JNISON, I. et al.(Ed.). **Foodborne microrganisms of public health significance**. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology Inc., 1997. Cap. 7, p. 231-264.

DEVANT, M.; ADELANTADO, C.; ANGLADA, A.; CALVO, M.A.; BACH, A. Effect of plant extract supplementation on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* carcass isolation in young Holstein bulls fed a high-concentrate diet. **Journal of Food Protection**, v.72, n.1, p.147-150, 2009.

DIEZ-GONZALEZ, F. et al. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, EUA, v.95, p. 211-225, 2003.

DOYLE, M.P. et al. *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M. P. et al. **Foodborne Pathogenic Bacteria**. ASM Press, p. 171-191, 1995.

DU PONT QUALICON. **Sistema BAX® - Análise de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com detecção automatizada**. 2002.

EDUARDO, M. B.; MELLO, M. L. R.; KATSUYA, E. M.; CAMPOS, J. C.; KITAGAWA, B. Y. **Síndrome Hemolítico-Hurêmica Ë Normas e Instruções**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2002.

Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/shu.pdf>. Acesso em 26 mar 2008.

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

ELDER, R. O. et al. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 2999-3003, 2000.

ELSTROM, R. Anemia hemolítica. **Enciclopedia Médica en Español**, review provided by VeriMed Healthcare Network, 2001a. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000571.htm>>. Acesso em 15 nov 08.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 652p.

FAITH, N. G.; SHERE, J. A.; BROSCH, R. et al. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1519-1525, 1996.

FDA/CFSAN. *Escherichia coli* O157:H7. In: **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook (The Í Bad Bug BookÍ)**. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2001. Cap. 15. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/badbug.zip>>. Acesso em 20 mar 2008.

FSA - FOOD STANDARDS AGENCY. **Red Meat Safety & Clean Livestock**. 2002. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/redmeatsafety.pdf>>. Acesso em 02 nov 2009.

FRANÇA FILHO, A.T.; MESQUITA, A.J. et al. Qualidade bacteriológica de miêscarças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.315-325, 2006.

FRANCO, B.D.G.M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. 182 p.

FRANCO,R.M. **Escherichia coli: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana**. 2002. 144 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.) . Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói / RJ.

GADEA, M.P. et al. Primer aislamiento em Uruguay de Escherichia coli productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 em uma niña com síndrome urémico hemolítico. **Revista Médica del Uruguay**, v.20, p.79-81, 2004.

GARBER, L. P.; WELLS, S. J.; HANCOCK, D. D. et al. Risk factors for fecal shedding of Escherichia coli O157:H7 in dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.207, p. 46-49, 1995.

GIL, J.I. **Manual de Inspeção Sanitária de carnes**. 2ed. Portugal: Fundação Caloust Gulbenkian, 2002, p. 485.

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

GILL, C.O.; BADONI, M.; JONES, T. Hygienic effects of trimming and washing operations in a beef-carcass-dressing process. **Journal of Food Protection**, v.59, n.6, p.666-669, 1996b.

GOMEZ, D. et al. Aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga durante un brote de gastroenteritis en un Jardín Maternal de la ciudad de Mar del Plata. **Revista Argentina de Microbiología**, v.37, p.176-181, 2005.

GRAU, F.H. Microbial ecology of meat and poultry. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. (ed.). **Advances in meat research: meat and poultry microbiology**. Westport: AVI Publish, 1986. v. 2, cap. 1, p. 1-47.

GRAU, F.H. Microbiology of unpacked meat. **Advances in Meat Science and Tecnology**. CSIRO (Australia), 1974.

GRAUKE, L. J. et al. Gastrointestinal Tract Location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2269-2277, 2002.

GRAUKE, L.J. et al. Acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 from gastrointestinal tract of cattle fed hay or grain. **Veterinary Microbiology**. v. 95, p. 211 225, 2003.

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

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated Hemolytic Uremic Syndrome. **Epidemiologic Reviews**, v. 13, p. 60-98, 1991.

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.

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.

HARRIS, J.L.; STILES, M.E. Reability of *Escherichia coli* counts for vacuum packaged ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 266-270, 1992.

HOGUE, A.T. et al. Pathogen reduction and hazard analisys and critical control point (HACCP) systems for meat and poultry. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.14, n.1, p.151-164, 1998.

HUNTINGTON, G.B. Starch utilization by ruminants from basics to the bink. **J. Anim. Sci.**, v.75, p. 852-867, 1997.

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

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

IRINO, K. et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.29-36, 2005.

JACKSON, M. P.; NEILL, R. J.; O'BRIEN, A. D. et al. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded

by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiology Letters**, v. 44, p. 109-114, 1987.

JARDIM, F.B.B. et al. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.277-282, 2006.

JAY, J. M. Indicators of food microbiological quality and safety. **Modern food microbiology**. 6.ed. Maryland: Aspen Publication, 2000. p.387-407.

JORDAN, D., MCEWEN, S.A. Effect of duration of fasting and a short-term high roughage ration on the concentration of *Escherichia coli* biotype 1 in cattle feces. **Journal of Food Protection**, v.61, p. 531-534, 1998.

KALCHAYANAND, N.; BRICHTA-HARHAY, D.M; ARTHUR, T.M. et al. Prevalence rates of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* at different sampling sites on cattle hides at a feedlot and processing plant. **Journal of Food Protection**, v.72, n.6, p.1267-1271, 2009.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1.

LEHRER, M. Purpura. **Enciclopedia Médica en español**, review provided by VeriMed Healthcare Network, 2001. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003232.htm>>. Acesso em 19 mar 2008.

LIOR, H. *Escherichia coli* O157:H7 and verocitoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 14, n. 7, p. 378-382, 1994.

MADDEN, R.H.; MURRAY, K.A.; GILMOUR, A. Determination of the principal points of product contamination during beef carcass dressing processes in Northern Ireland. **Journal of Food Protection**, v.67, n.7, p.1494-1496, 2004.

MECHIE, S.C. et al. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. **Epidemiol. Infect.**, n.118, p.17-25, 1997.

MEICHTRI, L. et al. Shiga toxin-producing *E. coli* in health young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. **Journal of Food Microbiology**, v.96, p.189-198, 2004.

MENDONÇA, C.; GRANADA, G.G. Coliformes em açougues de Pelotas-RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5, n.1, p. 76-77, 1999.

MERCADO, E.C. Síndrome Urémico Hemolítico: ¿por qué Argentina? **Revista Argentina de Microbiología**, v.39, p.191-192, 2007.

MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. Inhibition of growth methaneproducing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl-SCoA reductase inhibitors. **J. Dairy Sci.** v.84, p. 1445. 1448, 2001.

NARVÁEZ-BRAVO, C.A. et al. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 em muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. **Revista Científica FCV LUZ**, v.17, n.3, p.239-255, 2007.

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

NACMCF - National Advisory Committee Of Microbiological Criteria For Foods. Generic HACCP for raw beef. **Food Microbiology**, v. 10, p. 449-488, 1993.

NAYLOR, S.W. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v.295, p. 419-441, 2005.

O'SULLIVAN, D. J. Methods for the analysis of intestinal microflora. In: TANNOCK, G. W. (Ed.). **Probiotics: a Critical Review**. Wyomondham: Horizon Scientific Press, 1999. Cap. 3.

O'BRIEN, A. D.; TESH, V. L.; DONOHUE-ROLFE, A. et al. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 180, p. 65-94, 1992.

OMISAKIN, F. et al. Concentration and Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.5, p.2444-2447, 2003.

PADHYE, N. V.; DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**, v.55, n. 7, p. 555-556, 1992.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 271-274, 2002.

PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M. C.; PATON, J. C. Characterization of *saa*, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6999-7009, 2001.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiological Reviews**, v.11, n.3, p.450-479, 1998.

PETRIE, A.; WATSON, P. **Statistics for Veterinary and Animal Science**. Wiley-Blackwell, 2006. 312p.

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.

PICKERING, L. K.; OBRIG, T. G.; STAPLETON, F. B. Hemolytic-uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 13, p. 459-476, 1994.

PRATA, C.B. et al. A possível presença de *E. coli* O157:H7 em dejetos e carcaças de bovinos. **Revista Nacional da Carne**, v.383, p.88-93, 2009.

PRIEGO, R.; MEDINA, L.M.; JORDANO, R. Evaluation of Petrifilm series 2000 as a possible rapid method to count coliforms in foods. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 8, p. 1.137-1.140, 2000.

PRUIMBOOM-BREES, I.M. et al. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.97, p. 10325-10329, 2000.

QUINTANILLA, L.B.Z. **Anticorpos séricos anti *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) em adultos saudáveis da Grande São Paulo**. 2005.73 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) . Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo / SP.

RIGOBELLO, E.C. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p. 305-310, 2006.

RIGOBELLO, E.C.; SANTO, E.; MARIN, J.M. Beef carcass contamination by Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains in an abattoir in Brazil: characterization and resistance to antimicrobial drugs. **Foodborne Pathogens and Disease**. V.5, n.6, p. 811-817, 2008.

RIVAS, M. et al. Home-prepared hamburger and sporadic Hemolytic Uremic Syndrome, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.9, p.1184-1186, 2003.

RIVAS, M. et al. Epidemiologia del Síndrome Uremico Hemolitico em Argentina. Diagnostico del agente etiológico, reservorios y vias de transmision. **Medicina**, v.66, p.27-32, 2006.

RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.; BALBI, L. et al. Intestinal bleeding and occlusion associated with shiga toxin-producing *Escherichia coli* O127: H21. **Medicina**, Buenos Aires, v. 60, p. 249-252, 2000.

RIVERO, M.A. et al. *Escherichia coli* enterohemorrágica y Síndrome Uremico Hemolitico en Argentina. **Medicina**, v.64, p.352-356, 2004.

ROCHA, H. H. A. G. **Diagnóstico diferencial das principais causas de sangramento em uma unidade de emergência - visão clínica e laboratorial**. Disponível em: <http://www.lamina.com.br/p_informe-8.htm>. Acesso em: 26 mar 2008.

RODOLPHO, D.; MARIN, J.M. Isolation of shiga toxigenic *Escherichia coli* from butcheries in Taquaritinga city, State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.599-602, 2007.

ROLDÁN, M.L. et al. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. **Revista Argentina de Microbiología**, v.39, p.113-119, 2007.

SAAD, S.M.I; FRANCO, B.D.G.M. Influence of raw meat natural background flora on growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.272-277, 1999.

SALES, S.S. et al. Ocorrência de *E. coli* produtora de toxinas Shiga+ (STEC) na microbiota intestinal de bovinos destinados ao abate no município de São Luís. MA, Brasil. **Rev. Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, p.245-251, 2006.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1994. 448 p.

SANDHU, K. S.; CLARKE, R. C.; McFADDEN, K. et al. Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. **Epidemiology and Infection**, v. 116, p. 1-7, 1996.

SAVARINO, S. J.; McVEIGH, A.; WATSON, J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 1019-1022, 1996.

SCHMITT, C. K.; MEYSICK, K. C.; O'BRIEN, A. D. Bacterial toxins: friends or foes? **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 224-234, 1999.

SENYK, G.F.; KOZLOWSKI, S.M.; NOAR, P.S.; SHIPE, W.F.; BANDLER, D.K. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v.70, p. 1.152-1.158, 1987.

SILVA, M.P.; CAVALLI, D.R.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, p. 352-359, 2006.

SILVA, N. ***Escherichia coli* O157:H7 em alimentos**. 2004. 154 f. Tese . Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas / SP.

SMALL, A.; JAMES, C.; JAMES,S.; DAVIES, R.; LIEBANA, E.; HOWELL, M.; HUTCHINSON, M.; BUNCIC, S. Presence of *Salmonella* in the red meat abattoir lairage after routine cleansing and disinfection and on carcasses. **Journal of Food Protection**, v.69, p. 2342-2351, 2006.

SUMNER, J. et al. Microbial contamination on beef and sheep carcasses in South Australia. **International Journal of Food Microbiology**, v.81. n.3, p. 255-260, 2003.

SOUSA, S.P. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: A mini review. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.12, n.3, p. 363-373, 2006.

STELLA, A.E. et al. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *E. coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.1, p.66-74, 2008.

TAKEDA, Y. Shiga and Shiga-like (Vero) toxins. In MOSS, J.; IGLEWSKI, B.; VAUGHAN, M.; TU, A. T. (Ed.). **Bacterial toxins and virulence factors in disease**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. p. 313-326.

TORRES, A. G.; PAYNE, S. M. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v. 23, p. 825 833, 1997.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. Editora Atheneu, 4 ed, São Paulo, 2005, 679p.

TRISTÃO, L.C.S. et al. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. **Veterinary Microbiology**, v.119, p.358-365, 2007.

TUTENEL, A.V.; PIERARD, D.; VAN HOOFF, J.; DE ZUTTER, L. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 contamination routes in a cattle slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v.66, p. 1564-1569, 2003.

VAN BRALE, M. et al. Effect of forage or grain diets with or without monensin on ruminal persistence and fecal *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.9, p. 5336-5342, 2004.

VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; DIAS, Â. M. G.; GOMES, T. A. T.; MEDEIROS, M. I. C.; ROCHA, M. M. M.; GUTH, B. E. C. Virulence Properties and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 2, p. 903-905, Feb. 2004.

VICENTE, H.I.G. et al. Shigatoxigenic *Escherichia coli* serogroups O157, O11 and O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.217-222, 2005.

W.H.O., 1998. **WHO/CSR/APH/98.8**. Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. Berlin, Germany, 23-26 June 1998. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_CSR_APH_98.8.pdf>. Acesso em 25 mar 2008.

WALLACE, R.J.; ARTHAUD, L.; NEWBOLD, C.J. Influence of *Yucca shidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.** v.60, p. 1762. 1767, 1994.

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

WEAGANT, S. D.; BRYANT, J. L.; JINNEMN, K. G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection**, v.58, n. 1, p. 7-12, 1995.

ZWEIFEL, C. et al. Microbiological contamination of cattle and pig carcasses at five abattoirs determined by swab sampling in accordance with EU Decision 2001/471/EC. **Meat Science**, v.69, n.3, p.559-566, 2004.

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