

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

JEJUM PRÉ-ABATE DE BOVINOS CONFINADOS E AS CONDIÇÕES
HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DO ABATE

GUILHERME SICCA LOPES SAMPAIO

BOTUCATU, SP
FEVEREIRO DE 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

JEJUM PRÉ-ABATE DE BOVINOS CONFINADOS E AS CONDIÇÕES
HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DO ABATE

GUILHERME SICCA LOPES SAMPAIO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de concentração Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça – DEST/FCA/UNESP, Botucatu, SP.

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Adam Conte Júnior – DTA/FV/UFF, Niterói, RJ.

BOTUCATU, SP
FEVEREIRO DE 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Sampaio, Guilherme Sicca Lopes.

Jejum pré-abate de bovinos confinados e as condições
higiênico-sanitárias do abate / Guilherme Sicca Lopes
Sampaio. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Roberto de Oliveira Roça

Coorientador: Carlos Adam Conte Júnior

Capes: 50505009

1. Bovino de corte. 2. Bovino - Comportamento. 3.
Bovino - Carcaças. 4. Carne - Qualidade. 5. Condições
sanitárias. 6. Escherichia coli.

Palavras-chave: Carcaça; Curral de abate; Fezes; Pele;
STEC.

Nome do Autor: GUILHERME SICCA LOPES SAMPAIO

Título: JEJUM PRÉ-ABATE DE BOVINOS CONFINADOS E AS CONDIÇÕES
HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DO ABATE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^a. Luciana Miyagusku (Membro Titular)

Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública – UTASP/CCBS/UFMS, Campo Grande, MS

Prof. Dr. Luís Augusto Nero (Membro Titular)

Departamento de Veterinária – DVT/UFV, Viçosa, MG

Prof. Dr. Ricardo Seiti Yamatogi (Membro Titular)

Departamento de Veterinária – DVT/UFV, Viçosa, MG

Prof. Dr. Mário de Beni Arrigoni (Membro Titular)

Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – DMNA/FMVZ/UNESP, Botucatu, SP

Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça (Presidente e Orientador)

Departamento de Economia Sociologia e Tecnologia – DEST/FCA/UNESP, Botucatu, SP

Data da Defesa: 13 de janeiro de 2017.

Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário.

Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar a onde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.

Bill Gates

AGRADECIMENTOS

À minha família, Aida Maria, Ivando e Gustavo Sampaio, pelo amor e apoio incondicional.

À Renata Lomele, meu “braço direito”, pela amizade, empatia e dedicação.

Ao nosso time “***made in Roça***”, Bruna D. Smaniotto, Carolina T. Santos, Nara L.C. Delbem e Nataly C. Sobral, pela amizade e excelente trabalho em equipe. Assim como, aos nossos colaboradores, Larissa M. Pinho, Letícia S. Souza, Luiz Gustavo Bicas e Arthur P. Almeida.

Ao meu orientador, Prof. Roberto de Oliveira Roça, pela confiança, ensinamentos, oportunidades e paciência.

Ao meu co-orientador, Prof. Carlos Adam Conte Jr., pelo apoio à pesquisa.

À Prof^a. Magda Saiuri Kimoto do “International Language Center – ILC”, Botucatu, SP, pela amizade, carinho e apoio.

À empresa JBS, em especial, Camila Brossi, Bassem Sami Akl Akl, João Paulo S. T. Bastos e Fernando César N. Saltão; à equipe da Unidade I JBS de Campo Grande, MS, em especial, Marcelo Menegassi, Larissa Borges, Miguel Júnior, Nahuana Silva, Fádia Priscila, Neuza Braga, Kassia Valle, Felipe Mattos, Nelson Jardim, Diogo Watanabe, Rodrigo Zanoni, Luiz Henrique Santos, Laércio Guagliano e Aloisio Mastelaro; e à equipe do Confinamento JBS de Terenos, MS, em especial, Mário Yoneda e Valgley Ferreira, pelo total apoio e interesse na execução deste estudo.

Ao grupo de trabalho do Serviço de Inspeção Federal, SIF nº 1662, em especial, Newton Netto, Júlio Maffei, Ademir Guerra, Ana Paula Mangieri e Rafael Machado, pelo apoio e interesse na execução desta pesquisa.

À Prof^a. Luciana Miyagusku e sua equipe de pesquisa, em especial, Lúcia Medrado, Jakelinne Donadeli, Dayenne Martins e Prof^a. Fabíola Brandão, pela amizade e apoio à essa pesquisa.

Ao Prof. João Pessoa Araújo Jr. e sua equipe de pesquisa, em especial, Camila D. Malossi, Prof. Ricardo S. Yamatogi e Prof. Rodrigo T. Hernandez, pelo total apoio à realização das análises moleculares.

À Prof^a. Luzia A. Trinca pelo suporte na elaboração dos modelos estatísticos.

Ao Prof. Paulo R. L. Meirelles e sua equipe de pesquisa, assim como, ao Rafael Lopes, pelo apoio na realização das análises bromatológicas.

Aos professores José Carlos de Figueiredo Pantoja e João Pessoa Araújo Jr., pelos ensinamentos e contribuições no Exame Geral de Qualificação.

Aos professores Luciana Miyagusku, Luís Augusto Nero, Ricardo Seiti Yamatogi e Mário de Beni Arrigoni, pelos ensinamentos e contribuições na Defesa de Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Bolsa de Doutorado (Processo FAPESP nº 2014/01109-9) e pelo Auxílio à Pesquisa - Regular (Processo FAPESP nº 2015/02208-3), permitindo que este curso de doutorado e esta pesquisa fossem realizados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa de Doutorado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e seu corpo docente, discente e técnico, pelo apoio físico e humano à realização desta pesquisa, assim como, pelos ensinamentos e oportunidades.

Muito obrigado!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01- Fluxograma de trabalho realizado para a colheita e processamento das amostras obtidas.	19
FIGURA 02 - Equação preditiva, com erro padrão, do pH fecal de bovinos considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos.	30
FIGURA 03 - Equação preditiva, com erro padrão, do percentual de matéria seca (MS%) das fezes de bovinos considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos.	30
FIGURA 04 - Equação preditiva, com erro padrão, dos percentuais de fibra em detergente neutro (FDN%) e ácido (FDA%) das fezes de bovinos considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos.	31
FIGURA 05 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de bactérias aeróbias mesófilas das fezes dos bovinos, considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos.	32
FIGURA 06 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio das contagens de E. coli genérica e coliformes totais nas fezes de bovinos submetidos à diferentes períodos de jejum pré-abate.	32
FIGURA 07 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de cópias do gene stx ₁ (E. coli STEC) das fezes (intestino grosso), considerando ou não os resultados negativos, em relação ao tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos.	34
FIGURA 08 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de cópias do gene stx ₂ (E. coli STEC) das fezes (intestino grosso), considerando ou não os resultados negativos, em relação ao tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos.	34
FIGURA 09 – Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de STEC (stx ₁ e stx ₂) na pele da região do peito dos bovinos.	36

FIGURA 10 - Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de EPEC (eae) na pele da região do peito dos bovinos.	36
FIGURA 11 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de EPEC na pele da região do peito, considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos.	37
FIGURA 12 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de STEC (stx ₁) na pele da região do peito, considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos.	38
FIGURA 13 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de bactérias aeróbias mesófilas na superfície de carcaças, considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos.	39
FIGURA 14 - Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de E. coli genérica e coliformes totais na superfície das carcaças.	40
FIGURA 15 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de E. coli genérica na superfície das carcaças, considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos.	41
FIGURA 16 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de coliformes totais na superfície de carcaças, considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos.	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Formação e estruturação dos tratamentos	17
TABELA 02– Descrição dos iniciadores utilizados (“primers”).....	26
TABELA 03 - Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de STEC e EPEC nas fezes dos bovinos	33
TABELA 04 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio da contagem de EPEC nas fezes dos bovinos	33
TABELA 05 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio dos parâmetros avaliados na pele da região do peito dos bovinos	35
TABELA 06 - Razão de Chances (“Odds Ratio”), com Intervalo de Confiança (95%), de EPEC e STEC na pele da região do peito dos bovinos	35
TABELA 07 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio das contagens de STEC e EPEC na pele da região do peito dos bovinos	38
TABELA 08 - Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de bovinos com ruptura do TGI e/ou com desvio ao DIF, durante o processo de abate	38
TABELA 09 - Razão de Chances (“Odds Ratio”), com Intervalo de Confiança (95%), de E. coli genérica e coliformes totais na superfície das carcaças	40
TABELA 10 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio das contagens de E. coli genérica e coliformes totais na superfície das carcaças	42

SUMÁRIO

RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 PERIGOS BIOLÓGICOS ASSOCIADOS À CARNE BOVINA.....	4
2.2 ECOLOGIA E A EXCREÇÃO FECAL DE STEC PELOS BOVINOS.....	8
2.3 BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS PARA A REDUÇÃO DE STEC	9
2.4 PERÍODO PRÉ-ABATE E A CONTAMINAÇÃO DA CARCAÇA BOVINA	11
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL	15
4.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS	20
4.2.1 Amostragem das fezes.....	20
4.2.2 Amostragem da pele íntegra	20
4.2.3 Amostragem das meias carcaças esquerdas quentes	20
4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	21
4.3.1 Análises microbianas	21
4.3.2 Análises físico-químicas das fezes	22
4.3.3 Análises moleculares	23
4.4 PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	27
4.4.1 Variáveis quantitativas	28
4.4.2 Variáveis binárias	29
5 RESULTADOS.....	30
5.1 EXCREÇÃO FECAL DE INDICADORES HIGIÊNICO-SANITÁRIOS E DE STEC E EPEC.....	30
5.1.1 Características físico-químicas das fezes	30
5.1.2 Excreção fecal de indicadores higiênico-sanitários.....	31
5.1.3 Excreção fecal de STEC e EPEC	33
5.2 CONTAMINAÇÃO DA PELE DOS BOVINOS.....	35

5.2.1 Indicadores higiênico-sanitários	35
5.2.2 STEC e EPEC	35
5.3 CONDIÇÃO HIGIÊNICA E SANITÁRIA DAS CARCAÇAS	38
5.3.1 Falhas sanitárias operacionais durante o processo de evisceração	38
5.3.2 Indicador higiênico-sanitário: bactérias aeróbias mesófilas	39
5.3.3 Indicadores higiênico-sanitários: <i>E. coli</i> genérica e coliformes totais.....	39
5.3.4 STEC e EPEC	42
6 DISCUSSÃO	43
6.1 EXCREÇÃO DE INDICADORES HIGIÊNICO-SANITÁRIOS	43
6.2 EXCREÇÃO DE STEC E EPEC	44
6.3 CONTAMINAÇÃO DA PELE DOS BOVINOS.....	46
6.4 CONDIÇÃO HIGIÊNICA E SANITÁRIA DAS CARCAÇAS	47
6.5 IMPLICAÇÕES	50
7 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
ARTIGO CIENTÍFICO	66
ANEXOS	89

SAMPAIO, G.S.L. **Jejum pré-abate de bovinos confinados e as condições higiênico-sanitárias do abate**. Botucatu, 2017. 106p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Um total de 180 bovinos *Bos indicus* (Nelore), terminados em confinamento, foi dividido em grupos com 6, 12 ou 24 horas de jejum pré-abate para verificar se a redução deste tempo resulta em melhor condição higiênica e sanitária durante o processo de abate. Amostras de fezes pré e pós-jejum, de pele e de carcaça foram colhidas e analisadas para ocorrências e contagens de bactérias aeróbias mesófilas, *Escherichia coli* genérica, coliformes totais, assim como, *E. coli* produtora de toxinas Shiga (STEC) e enteropatogênica (EPEC). As amostras de fezes também foram analisadas quanto ao pH e os teores percentuais de matéria seca (MS%) e de fibras em detergente neutro (FDN%) e ácido (FDA%). Os dados foram analisados com modelos logísticos, análises de variância e regressões, ao nível de 5% de significância. A extensão do tempo de jejum pré-abate reduziu a MS%, mas elevou o pH, FDN% e FDA% das fezes. O gradual aumento do jejum pré-abate resultou em maior excreção fecal de STEC (*stx*₁ e *stx*₂), entretanto, com decréscimo de aeróbios mesófilos, mas sem interferência na *E. coli* genérica. A extensão do tempo de jejum pré-abate também resultou na maior contaminação da pele por STEC (*stx*₁) e EPEC, assim como, das carcaças por aeróbios mesófilos, *E. coli* genérica e coliformes totais. Dessa forma, conclui-se que a condição higiênica e sanitária durante o processo de abate de bovinos pode ser melhorada com a redução do tempo de jejum pré-abate. Para as indústrias da carne isto pode representar a redução de custos operacionais e com a infraestrutura dos currais de abate, menos condenações e falhas no controle de produção, maior rendimento produtivo e incremento na validade comercial. A redução de STEC, além de ser um fomento à saúde pública, constitui-se em um estímulo à economia brasileira pela redução de barreiras comerciais e menor devolução de mercadorias.

Palavras-chave: Curral de abate, STEC, contaminação, fezes, pele, carcaça.

SAMPAIO, G.S.L. **Pre-harvest fasting time of feedlot-finished cattle and hygiene and safety slaughter conditions.** Botucatu, 2017. 106p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo, Brasil.

ABSTRACT

A total of 180 *Bos indicus* (Nelore) cattle finished in feedlot were divided into groups of 6, 12 or 24 hours of pre-harvest fasting to verify if time reduction results in better hygiene and sanitary conditions during the slaughter process. Pre-fasting and post-fasting samples of feces, and post-fasting samples of hide, and carcass were collected and analyzed for the occurrence and counting of mesophilic aerobic bacteria, generic *Escherichia coli*, total coliforms, as well as Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC). The feces samples were also analyzed for pH and content percentage of dry matter (DM%), neuter detergent fiber (NDF%) and acid detergent fiber (ADF%). Data were analyzed with logistic models, analyses of variance and regressions at 5% significance. The extension of pre-harvest fasting time reduced DM% but increased pH, NDF% and ADF% of feces. The gradual increase of pre-harvest fasting time resulted in greater fecal excretion of STEC (*stx*₁ and *stx*₂) with reduction of mesophilic aerobic bacteria, but without interference in generic *E. coli*. The extension of this time also resulted in greater contamination of hide by STEC (*stx*₁) and EPEC as well as of carcass by mesophilic aerobic bacteria, generic *E. coli* and total coliforms. Thus, it was concluded that the hygiene and sanitary condition during the slaughter process of bovines can be improved with the reduction of pre-harvest fasting time. For the meat industry, can represent a reduction of costs with operations and facilities of lairage pens, less with condemnations and failures in the production control besides a greater productive yield and increment in the commercial validity. STEC reduction, besides being a development in public health, becomes a stimulus to the Brazilian economy by decreasing commercial barriers and return of goods.

Key words: Lairage, STEC, contamination, feces, hide, beef carcass.

1 INTRODUÇÃO

Considerado fundamental para a qualidade global da carne e a performance econômica, o período pré-abate consiste na cadeia de eventos que vão desde a retirada dos bovinos da propriedade rural até o seu abate por sangria no estabelecimento comercial. As condutas adotadas durante este período irão repercutir no bem-estar dos animais, nos rendimentos produtivos, na condição higiênica e sanitária das carcaças, e nas características microbianas, físico-químicas e sensoriais da carne e seus derivados, como por exemplo, a inocuidade, a validade comercial, a coloração, a maciez e a exsudação (DUFFY et al., 2014; FERGUSON; WARNER, 2008; MIRANDA-DE-LA-LAMA et al., 2013; POINTON et al., 2012; TEKE et al., 2014).

No Brasil, o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, normativa elaborada em 1952 e vigente até o momento, exige a permanência mínima de 24 horas dos bovinos nos currais de abate para a realização do chamado período de jejum, descanso e dieta hídrica. Entretanto, caso o tempo de transporte seja inferior a 2 horas e os bovinos procedam de locais sob controle sanitário permanente, este período pode ser reduzido para 6 horas (BRASIL, 1952). Embora exista esta exceção, convencionou-se pelas indústrias que os bovinos sejam abatidos no dia posterior a sua chegada, independente das condições de manejo e de transporte.

Durante este período, a prática do jejum alimentar objetiva a redução do conteúdo no trato gastrointestinal (volume), o que minimiza o risco de ruptura do mesmo e de contaminações da carcaça durante o processo da evisceração (PARDI et al., 2005; POINTON et al., 2012; WARRISS, 2010). A prática do descanso e dieta hídrica nos currais de abate destinam-se, respectivamente, a recuperação dos substratos energéticos do músculo que possam ter sido consumidos (ENGLAND et al., 2013) e a reidratação dos animais (PIGHIN et al., 2015).

Em contrapartida, em muitos países da Europa e da América do Norte é comum que os animais sejam abatidos no mesmo dia do desembarque, salvo casos de lotes submetidos a longas jornadas de transporte, geralmente superiores a 6 horas (ARTHUR et al., 2007; DEWELL et al., 2008a; 2008b; FERGUSON; WARNER, 2008). Além disso, a União Europeia estabelece que os bovinos sejam alimentados se o abate não ocorrer em até 12 horas de jejum após a chegada dos bovinos no estabelecimento

(COMISSÃO EUROPEIA, 2009). Na Austrália, devido às condições produtivas, como longas jornadas de transporte, os bovinos são geralmente abatidos no dia posterior ao desembarque, mas há um bom-senso técnico-científico para a adoção desta conduta (FERGUSON; WARNER, 2008).

A evolução das Boas Práticas Agropecuárias na cadeia produtiva e do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC nos estabelecimentos de abate, reduziram problemas de qualidade da carne e melhoraram a condição higiênico-sanitária das carcaças bovinas (MILIOS et al., 2014; ROMERO et al., 2013). Entretanto, no Brasil, no que se refere ao período de jejum, descanso e dieta hídrica de bovinos, permanecem conceitos antigos e restritivos a todas as situações produtivas, não havendo um bom-senso técnico-científico. Desta forma, existe uma perceptível carência de evidências científicas baseadas no cenário nacional que auxiliem na adequação deste período aos mais diversos sistemas produtivos da carne bovina brasileira.

Experiências internacionais demonstram que é preferível o desenvolvimento de recomendações e guias de boas práticas do que a imposição de normas rígidas, inflexíveis e punitivas, que não são apropriadas a todos os casos (SENG; LAPORTE, 2005). O Brasil está prestes a ter um importante avanço nesse sentido, a reelaboração do RIISPOA, prevê em seu 71º artigo que: *“É proibido o abate de animais que não tenham permanecido em descanso, jejum e dieta hídrica, respeitadas as particularidades de cada espécie.”*. Isto significa que, haverá a oportunidade de instituir condutas práticas mais adequadas às específicas situações produtivas nacionais. Mas para que isso ocorra, existe a necessidade prévia de estudos técnico-científicos direcionados à cenários produtivos específicos.

A característica peculiar de cada sistema produtivo brasileiro estabelece uma gama de variáveis que devem ser controladas para correta inferência estatística, dentre elas: raça, sexo, idade, sistema de produção, nutrição, clima, sazonalidade, bem-estar animal, distância e condições de transporte, período de permanência e condições dos currais de abate, assim como, a qualidade das operações durante o abate. Além disso, a diferenciação entre os efeitos do transporte, do jejum e do curral de abate constitui-se em um dos principais desafios para orientações técnicas durante o período pré-abate.

Além do mais, embora os bovinos com características da raça Nelore representem quase a totalidade do rebanho de corte nacional (FERRAZ; FELÍCIO,

2010), ainda existe uma lacuna de conhecimento relacionado ao período de jejum alimentar adequado à esses animais, principalmente quando terminados em sistema produtivo intensivo.

Perante estes aspectos, o presente estudo teve como objetivo verificar se a redução do tempo de jejum pré-abate, entre 6 e 24 horas, de bovinos *Bos indicus* (Nelore), terminados em confinamento, resulta em melhor condição higiênica e sanitária durante o processo de abate.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PERIGOS BIOLÓGICOS ASSOCIADOS À CARNE BOVINA

A carne bovina é um dos principais alimentos envolvidos na ocorrência de zoonoses e toxi-infecções em humanos veiculadas por alimentos (EFSA, 2013a, 2013b). Nos últimos anos *Escherichia coli* produtora de toxinas Shiga (STEC), emergiu como o maior risco associado às carnes vermelhas, tanto em aspectos de saúde pública, como em barreiras técnicas e comerciais, e devoluções de mercadorias (DUFFY et al., 2014; EFSA, 2013a, 2013b).

E. coli é uma enterobactéria comensal do intestino de humanos e animais. A sua classificação pode ser realizada sorologicamente, por meio dos antígenos “O” dos lipopolissacarídeos (LPS) de membrana e dos antígenos “H” do flagelo bacteriano (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; GYLES, 2007). Assim como, por patotipos, de acordo com a patogenicidade e os sintomas clínicos, os quais estão diretamente relacionados aos fatores de virulência expressos (CDC-HHS, 2015).

Segundo o “Centers for Disease Control and Prevention - CDC/HHS/USA” (CDC-HHS, 2015), seis patotipos estão relacionados à diarreia em humanos e são coletivamente referidos como *E. coli* Diarreiogênicas (DEC): *E. coli* produtora de toxinas Shiga (STEC), sendo esta a mais frequente nas toxi-infecções em humanos veiculadas por alimentos; *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* Enteropatogênica (EPEC); *E. coli* Enteroagregativa (EAEC, ou EAaggEC); *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC); e *E. coli* Aderente Difusa (DAEC).

Animais ruminantes, especialmente os bovinos, são os principais reservatórios naturais dos patotipos STEC e EPEC, e estão epidemiologicamente relacionados à maioria dos surtos e mortes de humanos por estes grupos de patógenos (BAKER et al., 2016; BUNCIC et al., 2014; CROSSLAND et al., 2015; DUFFY et al., 2014).

EPEC são frequentemente associadas à diarreia acometendo crianças, principalmente nos países em desenvolvimento. Em 1995, EPEC foi classificada em duas subcategorias: EPEC típica (EPEC-t) e atípica (EPEC-a). EPEC-t são identificadas pela presença do gene *eae* (*E. coli* “attaching and effacing”) e do plasmídeo EAF (EPEC “adherence factor”), com comportamento epidemiológico restrito aos seres humanos e patogenia bem definida. Entretanto, EPEC-a além de estar associada à diarreia humana, pode ser encontrada em diversos animais, alimentos e estar presente

tanto em ambientes aquáticos, como terrestres. Estas também apresentam o gene *eae*, porém são desprovidas do plasmídeo EAF que codifica a adesina “type IV bundle-forming pilus (BFP)” (CLEARY et al., 2004; GIRON et al., 1991; MOXLEY; SMITH, 2010; SOUZA et al., 2016).

O principal mecanismo de patogenicidade da EPEC consiste na lesão conhecida por “attaching-effacing” (lesão A/E), que se caracteriza pela destruição de microvilosidades, adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal e a agregação de actina polarizada e de outros componentes do citoesqueleto nos locais de fixação da bactéria, resultando na formação característica do pedestal (MOXLEY; SMITH, 2010; PATON; PATON, 1998; TRABULSI et al., 2002).

Os determinantes genéticos para a produção da lesão A/E estão localizados no “locus of enterocyte effacement (LEE)”, uma região de patogenicidade responsável pela codificação da proteína de membrana “intimin”, um sistema de secreção tipo III, assim como, pela codificação do “translocated intimin receptor (TIR)”, que constitui-se no receptor da “intimin” na célula hospedeira. A “intimin” é codificada pelo gene *eae* e são conhecidas 19 variantes, que podem resultar na especificidade para diferentes tecidos do hospedeiro (BOLTON, 2011; GOOSNEY et al., 1999; KAPER et al., 2004; MOXLEY; SMITH, 2010; PERNA et al., 1998).

STEC é definida pela produção de pelo menos um tipo de “Shiga toxin (Stx)”. Os dois maiores tipos são “Shiga toxin 1 (Stx1)” e “Shiga toxin 2 (Stx2)”. Estes são geneticamente relacionados, mas antigenicamente distintos (GYLES, 2007).

As Shiga toxinas são proteínas, com estrutura quarternária AB₅, compostas por duas subunidades. A subunidade A (StxA) possui atividade enzimática e a subunidade B (StxB) se liga a receptores de membrana da célula hospedeira (como o glicolípídeo “globotriaosylceramide – Gb₃”), permitindo a entrada da toxina no citoplasma. Durante este processo, a subunidade A é clivada em fragmentos A1 e A2. O fragmento livre A1 atua no complexo de Golgi e no retículo citoplasmático comprometendo a síntese proteica, o que resulta na apoptose celular (VANAJA, et al., 2013). Esta toxina na corrente circulatória pode resultar em hemólise, lesão endotelial, oclusão vascular e nefrite (KAPER et al., 2004), além da Síndrome Hemolítico Urêmica – SHU, caracterizada por insuficiência renal aguda, que acomete principalmente crianças menores de cinco anos, idosos e imunocomprometidos (FULLER et al., 2011; GOMES

et al., 2016; HE et al., 2012; KARMALI et al., 2010), assim como, da Trombocitopenia Trombótica Púrpura (TTP) em adultos (PAULA et al., 2014).

As toxinas Shiga são carregadas por bacteriófagos lisogênicos e são conhecidas 107 variantes (14 de Stx1 e 93 de Stx2) (SCHEUTZ, 2014; SCHEUTZ, et al 2012), com alguns subtipos de Stx2 frequentemente associados à severos casos em humanos, como colite hemorrágica e SHU, especialmente quando existe a combinação com o gene *eae* (GOMES et al., 2016; PERSSON, et al 2007; USDA-FSIS, 2012b).

São conhecidos mais de 472 sorotipos de STEC (SCHEUTZ, 2014). As que apresentam associação com o gene *eae* são conhecidas como STEC *eae*⁺, antiga *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), e apresentam cepas com alta virulência para os seres humanos, como *E. coli* O157:H7, que foi a primeira cepa STEC reconhecida como uma ameaça à saúde pública (HE et al., 2012; KARMALI et al., 2010; RILEY et al., 1983).

E. coli O157:H7 é o sorotipo mais isolado de surtos em humanos nos Estados Unidos, Canadá e Argentina, principalmente dos casos com a necessidade de hospitalização (CRIM et al., 2014; GOULD et al., 2013; TARR et al., 2005). Em outros países, como Austrália, Alemanha e Austria, outros sorotipos, conhecidos por STEC “non-O157”, são os mais incriminados nos surtos em humanos (TARR et al., 2005).

Nos Estados Unidos, alimentos de origem bovina, principalmente crus ou mal cozidos, estão relacionados a aproximadamente 75% dos surtos por STEC O157 (CALLAWAY et al., 2009). Devido a sua importância em saúde pública e econômica, existe um vasto conhecimento a respeito da ecologia da *E. coli* O157:H7 no trato gastrointestinal dos bovinos, assim como, das suas características epidemiológicas (CALLAWAY et al., 2013a; NASTASIJEVIC et al., 2014). Entretanto, neste sentido, pouco se sabe sobre os demais sorotipos de STEC (MONAGHAN et al., 2011; POLIFRONI et al., 2012).

Muitos sorotipos de não-O157 STEC também são responsáveis por diarreias e colites hemorrágicas, síndrome hemolítico urêmica (SHU) e mortes em humanos (BUNCIC et al., 2014; EFSA, 2013c; KARMALI et al., 2010). Em vista disso, seis sorotipos mais frequentes, conhecidos como “top six non-O157 STEC” (O26, O45, O103, O111, O121 e O145), foram declarados pelo governo dos Estados Unidos, junto com o sorotipo O157, como adulterantes da carne bovina (USDA-FSIS, 2012a). O surto de *E. coli* O104:H4 na Alemanha em 2011 afetou 3.816 pessoas e ocasionou 54 mortes

(FRANK et al., 2011). Diferentes cepas de STEC causam anualmente mais de 175 mil casos em humanos e custam mais de um bilhão de dólares à economia dos Estados Unidos (SCALLAN et al., 2011).

Além de diferenças ecológicas e epidemiológicas entre as linhagens de *E. coli* O157:H7 (ZHANG et al., 2007), inúmeros estudos também têm caracterizado diferenças genômicas, ecológicas e epidemiológicas entre os demais sorotipos de STEC (BERGHOLZ; WHITTAM, 2007; DUFFY et al., 2014; FREE et al., 2012; FREMAUX et al., 2007). Portanto, estratégias de controle baseadas em um único sorotipo tendem a ser insuficientes e ineficazes (CROSSLAND et al., 2015; DUFFY et al., 2014). Os sorotipos de STEC mais associados a surtos severos em humanos na Europa foram O157, O26, O103, O145 e O111 (EFSA, 2013c), e nos Estados Unidos foram O157, O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (USDA-FSIS, 2012b).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP) determina que os estabelecimentos sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF), especializados no abate e/ou na desossa de bovinos, realizem o monitoramento de *Salmonella* spp, de *E. coli* O157:H7 e de seis sorotipos não-O157 STEC (O26, O45, O103, O111, O121 e O145) na carne bovina *in natura* (BRASIL, 2015). Embora a incidência de SHU no Brasil seja baixa e somente dois casos de *E. coli* O157:H7 tenham sido descritos, sorotipos importantes como O26, O103, O111 e O145 têm sido isolados de pacientes, assim como alguns sorotipos incomuns (O1, O24 e O77). Além disso, altas prevalências de STEC têm sido verificadas nas fezes de animais zootécnicos, como ovinos, bovinos e suínos, inclusive para os sorotipos O157:H7 e O103:H2, que estão frequentemente relacionados aos surtos em humanos (GOMES et al., 2016).

As salmoneloses são a segunda maior causa de doença entérica bacteriana em humanos no mundo, geralmente associadas com produtos de origem animal. A carne e seus derivados são considerados importantes fatores de risco para *Salmonella* spp. (DALLAL et al., 2010; DONG et al., 2014; EFSA, 2013b), entretanto, sua incidência em carcaças bovinas é baixa e os sorotipos geralmente isolados pelos pesquisadores são raramente associados aos surtos de salmonelose em humanos (BUNCIC et al., 2014; COSSI et al., 2014). Na Europa a carne bovina é associada com a minoria (0,6%) dos casos de salmonelose humana (EFSA, 2011).

Nos estabelecimentos de abate e processamento, bactérias indicadoras, como mesófilos aeróbios, enterobactérias e *E. coli*, são utilizadas durante o processo de verificação e validação do sistema APPCC. Embora suas correlações com a prevalência ou com o nível de patógenos não tenha sido comprovada, estas sugerem a possibilidade da ocorrência de patógenos, por demonstrarem a condição higiênica e contaminações de origem fecal (MILIOS et al., 2014; COMISSÃO EUROPEIA, 2007; USDA-FSIS, 1996). Em estabelecimentos de abate que utilizam controle estatístico de processo, aumentos na ocorrência ou na contagem desses indicadores bacterianos disparam alertas de falha higiênico-sanitária no controle de produção, o que resulta na investigação e adoção de ações corretivas e, em alguns casos, na reavaliação do plano APPCC (AQIS 2003; 2007; SOFOS et al., 1999; USDA-FSIS, 1996).

2.2 ECOLOGIA E A EXCREÇÃO FECAL DE STEC PELOS BOVINOS

Enquanto espécies como suínos (TSENG et al., 2014), cães (GYLES; FAIRBROTHER, 2010) e seres humanos (KARMALI et al., 2010) são clinicamente acometidos por STEC, com excessão dos bezerros (SHAW et al., 2004), os bovinos adultos são geralmente assintomáticos (MATHUSA et al., 2010; MUNNS et al., 2015). Isto ocorre, principalmente, devido a ausência de receptores (como o Gb₃) para a ligação das toxinas Shiga (CALLAWAY et al., 2013a; PRUIMBOOM-BRESS et al., 2000), o que permite relacionamento comensal entre STEC e bovinos, tornando estes animais um dos principais responsáveis pela disseminação de STEC (CROSSLAND et al., 2015; FERENS; HOVDE, 2011; MATHUSA et al., 2010; SMITH, 2014).

Embora *E. coli* O157:H7 sobreviva no rúmen (RASMUSSEN et al., 1999), a porção final do reto constitui-se no local primário de colonização, principalmente a junção reto-anal, devido a maior quantidade de células linfóides (GRAUKE et al., 2002; NAYLOR et al., 2003; SMITH, 2014). Além disso, os principais limitantes de *E. coli* genérica e *E. coli* O157:H7 no trato gastrointestinal (TGI) de bovinos são o baixo pH e a alta concentração de ácidos orgânicos, como acético, propiônico, butírico e láctico, devido a sua citotoxicidade (CALLAWAY et al., 2013a; CALLAWAY et al., 2009; CROSSLAND et al., 2015; POINTON et al., 2012). Portanto, o intestino grosso constitui-se no principal local de colonização e multiplicação de *E. coli* O157:H7, devido ao pH mais elevado e à menor concentração desses ácidos orgânicos (ARTHUR et al., 2010; CALLAWAY et al., 2013a; DUFFY et al., 2014).

De acordo com Chase-Topping et al. (2008), define-se como bovino “super shedding” aquele que está excretando pelo menos 10^4 UFC (unidades formadoras de colônia)/g de *E. coli* O157:H7 pelas fezes. Esta definição também pode ser extrapolada para os outros sorotipos de não-O157 STEC (MENRATH et al., 2010). Bovinos “super shedding” estão incriminados nas maiores taxas de transmissão no rebanho e de contaminação cruzada direta e indireta por *E. coli* O157:H7 (ARTHUR et al., 2013).

A persistência da colonização e a ocorrência de bovinos “super shedding”, além de estar relacionada com a resposta imune dos bovinos (CALLAWAY et al., 2013a), também está associada aos fatores de virulência presentes nas cepas de *E. coli* O157:H7, como a existência das proteínas “Intimin” e “Tir”, associadas a lesão “attaching-effacing” (pedestal) (NAYLOR et al., 2005) e a presença de fatores de aderência (STEVENS et al., 2002).

2.3 BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS PARA A REDUÇÃO DE STEC

A sazonalidade constitui-se no fator de risco mais frequente e consistentemente reportado para a excreção de STEC, tanto para bovinos de corte como de leite. Os maiores níveis de excreção fecal de STEC são relatados no verão, durante os meses quentes do ano (CALLAWAY et al., 2013a; MENRATH et al., 2010; SMITH et al., 2013).

Locais com acúmulo de matéria orgânica, como baias e bebedouros, têm sido associados à alta capacidade de sobrevivência e até mesmo de multiplicação de *E. coli* O157:H7. Neste sentido, a manutenção das baias secas e com alta incidência de luz solar, a frequente limpeza das baias e dos bebedouros, a realização de compostagem e a cloração da água fornecida aos animais, são boas práticas que têm sido associadas à redução de STEC no rebanho bovino (CALLAWAY et al., 2013a; CROSSLAND et al., 2015; GRAHAM; NACHMAN, 2010; SEMENOV et al., 2010).

Devido a fatores imunológicos, os bovinos jovens, como bezerros e novilhos, possuem maior taxa de excreção de STEC do que os adultos, portanto, recomenda-se a segregação do rebanho por idade para reduzir a disseminação (CHO et al., 2013; FARROKH et al., 2013). Recomenda-se também evitar a mistura de animais de diferentes lotes e a adição de novos animais ao rebanho, conhecidos como bovinos “super spreaders”, devido ao contato extra que será gerado entre os animais para o

reconhecimento e o restabelecimento das relações sociais (hierarquia), o que também favorece a disseminação de STEC (CHASE-TOPPING et al., 2008; CROSSLAND et al., 2015). Além disso, falhas de biossegurança, como o contato dos bovinos com outras espécies, tais como, ovinos, suínos, cães, animais selvagens, pássaros e insetos, também têm sido incriminados à maior ocorrência de STEC no rebanho (CALLAWAY et al., 2013a).

Friesema et al. (2011) verificaram relação direta entre a densidade animal e a ocorrência de surtos por *E. coli* O157:H7 em humanos. A densidade animal exerce um papel determinante na disseminação de STEC (CALLAWAY et al., 2013a; HERBERT et al., 2014), independente do tamanho do grupo (STACEY et al., 2007) e, principalmente, quando existe a presença de animais “super shedding” e/ou longos períodos de tempo nessa condição (ARTHUR et al., 2010).

O período pré-abate dos bovinos é considerado crítico para a disseminação de STEC (DUFFY et al., 2014), pois envolve situações como jejum alimentar, jejum hídrico, mistura de lotes, transporte, curral de abate e etapas de manejo dos animais, como o embarque e o desembarque (PARDI et al., 2005; WARRISS, 2010).

Além da alta densidade a que os animais são submetidos neste período (ARTHUR et al., 2010; POINTON et al., 2012), também pode existir um alto nível de estresse, mesmo com a execução de boas práticas visando o bem-estar dos animais (COSTA et al., 2012). Esta condição pode resultar em imunossupressão induzida por estresse (CALLAWAY et al., 2013a; COSTA et al., 2012; CROSSLAND et al., 2015). Longos períodos de estresse têm sido associados a depressão da função imune de bovinos, resultando na maior susceptibilidade à colonização e à multiplicação de *E. coli* O157:H7 no trato gastro intestinal (CALLAWAY et al., 2013a).

Durante o jejum alimentar ocorre absorção dos ácidos orgânicos, oriundos do metabolismo microbiano, como acético, propiônico e butírico, pelo trato gastrointestinal (TGI) dos bovinos, o que reflete na elevação do pH (BERCHIELLI et al., 2011). Esta condição resulta na maior concentração (multiplicação) de enterobactérias e *E. coli* genérica, assim como, na maior ocorrência (colonização) e concentração intestinal de *E. coli* O157:H7. Isto ocorre devido a supressão dos efeitos inibidores exercidos pelo baixo pH e a alta concentração de ácidos orgânicos sobre esses grupos bacterianos (BUCHKO

et al., 2000; CALLAWAY et al., 2013a; GREGORY et al., 2000; POINTON et al., 2012).

A dieta fornecida aos animais exerce papel fundamental na ecologia da STEC no TGI dos bovinos. Em síntese, uma dieta com maior taxa fermentativa possui expressivo metabolismo microbiano ruminal e menor metabolismo microbiano intestinal, o que resulta em maior pH e menor concentração de ácidos orgânicos no intestino grosso (BERCHIELLI et al., 2011; CALLAWAY et al., 2009, 2013a). Este é o principal motivo pelo qual bovinos criados em confinamento são geralmente mais acometidos por STEC do que os criados em pastagem (CALLAWAY et al., 2009, 2013a; CROSSLAND et al., 2015).

A partir destes conhecimentos, inúmeras estratégias nutricionais têm sido adotadas com o objetivo de reduzir a colonização, a multiplicação e a disseminação de STEC no rebanho bovino, tais como, mudanças bruscas na dieta, como o fornecimento de feno dias antes do abate, assim como, a inclusão na dieta de produtos cítricos, ácidos orgânicos, plantas ricas em taninos, compostos fenólicos, óleos essenciais e/ou alga marrom (CALLAWAY et al., 2009, 2013a; CROSSLAND et al., 2015). Outras estratégias incluem o uso de clorato de sódio (NaClO_3), prebióticos e/ou probióticos, antibióticos, vacinação, proteínas antimicrobianas, bacteriófagos e outros (CALLAWAY et al., 2013a, 2013b; CROSSLAND et al., 2015; JACOB; NAGARAJA, 2012; USDA-FSIS, 2014a). Além disso, cuidados devem ser tomados no fornecimento de compostos ionóforos para bovinos, devido a inibição de bactérias Gram-positivas e o favorecimento de Gram-negativas (CALLAWAY et al., 2013a).

2.4 PERÍODO PRÉ-ABATE E A CONTAMINAÇÃO DA CARÇA BOVINA

Por muitas décadas a prática do jejum alimentar pré-abate dos bovinos foi realizada com o objetivo de reduzir o volume do TGI e facilitar as operações sanitárias do processo de evisceração, minimizando o risco de ruptura do mesmo e de extravasamento do conteúdo gastrointestinal, o que poderia resultar na contaminação pontual de carcaças (PARDI et al., 2005; POINTON et al., 2012; WARRISS, 2010). Este aspecto não deixou de ser relevante, entretanto, a evolução tecnológica dos equipamentos e das operações sanitárias do processo de abate reduziram a ocorrência

deste tipo de contaminação (BUNCIC et al., 2014; MILIOS et al., 2014; POINTON et al., 2012; SERRAINO et al., 2012).

Para o atual sistema de abate, existe um consenso técnico-científico de que a pele é a principal fonte de contaminação da carcaça bovina, que ocorre especialmente durante o processo de esfolagem (ARTHUR et al., 2007; BUNCIC et al., 2014; HAUGE et al., 2012; SERRAINO et al., 2012). Em especial, a região do peito dos animais, que é considerada o local mais contaminado tanto da pele, como da carcaça (GILL, 2004; HAUGE et al., 2012; ISO, 2003; MCEVOY et al., 2000). Esta contaminação é mais expressiva em bovinos confinados, nos períodos quentes e chuvosos do ano e, principalmente, quando os animais são mantidos em locais com alta densidade animal, como ocorre no transporte e no curral de abate (CALLAWAY et al., 2013a; USDA-FSIS, 2014a). Nestes locais, um pequeno número de animais excretando *E. coli* O157:H7 podem causar massiva contaminação da pele dos demais animais presentes (ARTHUR et al., 2007).

Tamanha é a importância da pele como fonte de contaminação, que muitos países europeus, como França, Bélgica e Grã-Bretanha, estabeleceram critérios de avaliação visual dos bovinos previamente ao abate, sendo rejeitados para este processo os animais excessivamente sujos (AFSCA, 2006; BASTIEN et al., 2006; FSA, 2007).

A partir destes aspectos, tem-se recomendado a realização de um breve período de jejum alimentar pré-abate dos bovinos na propriedade rural (pré-embarque), com o objetivo de reduzir o volume do TGI dos animais e facilitar o processo de evisceração (POINTON et al., 2012; USDA-FSIS, 2014a). Além disso, a massiva excreção de fezes pelos bovinos, que transcorre nas primeiras horas do jejum alimentar, ocorrerá em um ambiente com baixa densidade animal, o que reduzirá a quantidade de fezes que serão excretadas durante o transporte e a permanência dos animais nos currais de abate, que são ambientes com alta densidade animal, resultando, desta forma, em peles menos contaminadas no momento do abate (CALLAWAY et al., 2013a; GREGORY et al., 2000; POINTON et al., 2012).

Existe um consenso técnico-científico de que o tempo de transporte e de curral de abate deve ser o menor possível, visto que existe um gradual aumento da contaminação das peles dos bovinos por *E. coli* STEC O157:H7 e, consequentemente, das carcaças, com a extensão destes períodos (ARTHUR et al., 2010; BUNCIC et al.,

2014; DUFFY et al., 2014; MILIOS et al., 2014; POINTON et al., 2012; USDA-FSIS, 2014a).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se a redução do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas de bovinos *Bos indicus* (Nelore), terminados em confinamento, resulta em melhor condição higiênica e sanitária durante o processo de abate.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Averiguar se a redução do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas resulta em:

- Menor excreção fecal de indicadores higiênico-sanitários e dos patógenos STEC e EPEC;
- Redução da contaminação da pele dos bovinos no momento do abate por estas bactérias;
- Melhor condição higiênica e sanitária das carcaças bovinas devido a redução destas bactérias na superfície das mesmas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo representa os aspectos de higiene veterinária e saúde pública do Projeto de Pesquisa “Jejum alimentar pré-abate de bovinos confinados: Avaliação microbiana, indicadores de estresse, metabolismo energético *post-mortem* e qualidade da carne”, o qual foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, conforme Protocolo nº 44/2015.

4.1 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Este estudo foi composto por três lotes de 60 bovinos, que foram abatidos em três dias distintos. Cada lote foi dividido aleatoriamente em três grupos (tratamentos), sendo: 20 bovinos com 6 horas, 20 com 12 horas e 20 com 24 horas de jejum pré-abate. Estes períodos foram determinados a partir do desalojamento de cada grupo da baia de confinamento até o momento do abate dos mesmos. Ao término dos três abates foram avaliados 180 bovinos, totalizando 60 animais por tratamento (n=60).

Os três lotes foram fornecidos por uma propriedade rural situada no Município de Terenos, MS, entorno do Pantanal, e os três abates foram realizados em um abatedouro frigorífico, sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal – SIF, localizado no Município de Campo Grande, MS, distante 24 km da propriedade rural, via estrada pavimentada.

Segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Automática de Campo Grande, MS, os 30 dias que antecederam os três abates, que foram realizados nos dias 06/10 e 17/12/2015 e 13/01/2016, tiveram precipitação acumulada de 237,4 mm, 145,6 mm e 388,8 mm, respectivamente.

Os Anexos 01, 02 e 03 ilustram a precipitação de chuva, a temperatura e a umidade relativa ambiente dos 3 dias que antecederam cada abate, respectivamente.

Os critérios de seleção dos lotes foram bovinos *Bos indicus*, com predomínio da raça Nelore, machos, não castrados, com até quatro dentes permanentes, faixa de peso entre 480 e 540 kg, e terminados em confinamento por 90 dias.

O confinamento de bovinos nesta propriedade rural é constituído por lotes de 100 a 125 bovinos rastreados SISBOV - Sistema Brasileiro de Identificação e Certificação de Bovinos e Bubalinos, os quais são alimentados quatro vezes ao dia

(07:00, 09:30, 13:00 e 15:30) com 16 a 17 kg de alimento por animal, sendo normalmente necessárias de 2 a 3 horas para o consumo de cada trato, sem sobras. A água dos bebedouros provém de nascente da propriedade rural e não sofre cloração.

A dieta fornecida aos bovinos foi composta, na proporção em matéria natural (M.N.%), por: 27,7% de silagem de capim, 37,6% de milho grão, 14,4% de glúten úmido de milho, 9% de caroço de algodão, 3,2% de casca de soja, 2,4% de torta de algodão, 2,2% de farelo de soja, 0,6% de uréia, 0,4% de Prote-N (Grasp) e 2,4% de núcleo confinamento.

Para garantir que nenhum dos grupos de bovinos iniciasse o jejum pré-abate na baía de confinamento foi aumentada a quantidade de alimento fornecida no último trato (às 15:30) do dia do estudo, de modo que sobrasse alimento no cocho no momento dos desalojamentos dos tratamentos 12 horas (às 22:00) e 06 horas (às 4:00). Os bovinos do tratamento 24 horas (desalojados às 10:00) não passaram por esta conduta, pois receberam o primeiro trato do dia (às 7:00) antes do desalojamento.

A Tabela 01 resume a formação e a estruturação dos tratamentos. Os três tratamentos foram submetidos às mesmas amostragens e às mesmas condições de embarque, transporte, desembarque e abate, diferindo somente no período de permanência dos animais nos currais de abate.

No curral da propriedade rural, os animais dos tratamentos foram, individualmente, contidos para a colheita de fezes pré-jejum. Logo em seguida, foram embarcados rumo ao estabelecimento de abate. Os transportes foram realizados em caminhões tipo Truck, previamente lavados com jato d'água potável, com densidade animal próxima à 400 kg/m². Após o desembarque, os animais de cada tratamento foram alojados em currais de abate distintos, previamente lavados com jato d'água potável, com densidade animal próxima à 180 kg/m². Os três currais foram designados na escala de abate de modo que os tratamentos fossem abatidos consecutivamente.

Durante o abate foram realizadas, simultaneamente, amostragens da pele, das fezes pós-jejum e registro das rupturas do trato gastrointestinal devido à falhas operacionais dos funcionários, assim como, o registro da ocorrência de desvio de carcaças para o Departamento de Inspeção Final (DIF) devido à contaminação por conteúdo gastrointestinal.

TABELA 01 - Formação e estruturação dos tratamentos

	Primeiro Abate			Segundo Abate			Terceiro Abate		
	24 horas	12 horas	6 horas	24 horas	12 horas	6 horas	24 horas	12 horas	6 horas
Número de Bovinos	20	20	20	20	20	20	20	20	20
<u>Data e horário:</u>									
Desalojamento da	05/10/2015	05/10/2015	06/10/2015	16/12/2015	16/12/2015	17/12/2015	12/01/2016	12/01/2016	13/01/2016
Baia de Confinamento	9:26	21:11	3:09	10:50	22:37	4:35	10:08	22:00	4:10
Entrada no Curral de Abate	05/10/2015	05/10/2015	06/10/2015	16/12/2015	17/12/2015	17/12/2015	12/01/2016	12/01/2016	13/01/2016
	12:21	23:46	5:03	13:11	0:58	6:56	12:47	23:49	6:26
Abate	06/10/2015	06/10/2015	06/10/2015	17/12/2015	17/12/2015	17/12/2015	13/01/2016	13/01/2016	13/01/2016
	09:34	09:41	09:49	10:40	10:50	11:00	10:10	10:20	10:30
<u>Duração (horas):</u>									
Jejum Hídrico	2:55	2:35	1:54	2:21	2:21	2:21	2:39	1:49	2:16
Curral de Abate	21:13	9:55	4:46	21:29	9:52	4:04	21:23	10:31	4:04
Jejum Alimentar	24:08	12:30	6:40	23:50	12:13	6:25	24:02	12:20	6:20

Em seguida ao abate, na câmara de resfriamento, foram realizadas as amostragens das carcaças. Todas as amostras colhidas foram imediatamente resfriadas e mantidas em caixa isotérmica com gelo até o processamento.

Todas as amostras foram inicialmente processadas nas dependências do Laboratório de Microbiologia – DTA/CCBS/UFMS, Campo Grande, MS, sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Luciana Miyagusku. O tempo máximo entre a colheita e o processamento das amostras não ultrapassou 24 horas, conforme recomendações da ISO 17604:2003 (ISO, 2003).

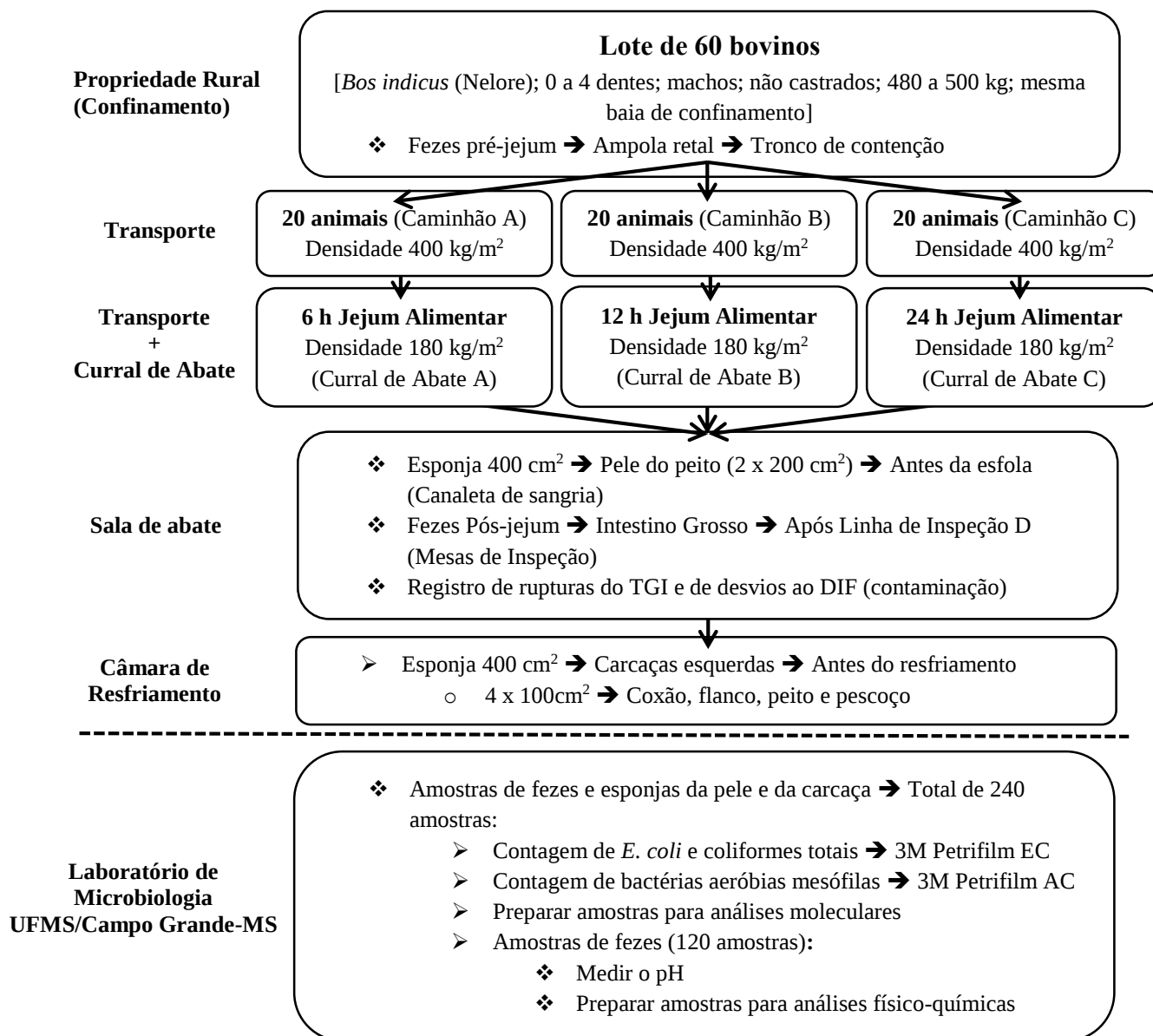
Neste local, todas as amostras foram analisadas para contagem de bactérias aeróbias mesófilas, *E. coli* genérica e coliformes totais. Das amostras de fezes pré e pós-jejum também foi medido o potencial hidrogeniônico (pH). Adicionalmente, alíquotas de todas as amostras foram preparadas para análises moleculares, além de alíquotas adicionais das fezes para análises físico-químicas. As alíquotas foram congeladas, transportadas para o Município de Botucatu, SP, e mantidas congeladas (-20°C) até análise.

As análises físico-químicas das fezes para matéria seca (MS%), fibra em detergente neutro (FDN%) e fibra em detergente ácido (FDA%), foram realizadas no Laboratório de Bromatologia – FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, sob a supervisão do Prof. Dr. Paulo Roberto de Lima Meirelles.

As análises moleculares de todas as amostras (total de 720) para qualificação (ocorrência) e quantificação dos patótipos de EPEC (gene *eae*) e STEC (genes *stx*₁ e *stx*₂), por bovino avaliado, foram conduzidas no Laboratório de Diagnóstico Molecular (LDM) do Instituto de Biotecnologia – IBTEC/IBB/UNESP, Botucatu, SP, sob a supervisão do Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior. Os controles positivo e negativo destas análises foram preparados no Laboratório de Patogenicidade Bacteriana – DMI/IBB/UNESP, Botucatu, SP, sob a supervisão do Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes.

Em síntese, a Figura 01 esquematiza o fluxograma de trabalho realizado para a colheita e o processamento das amostras obtidas.

CONSIDERANDO UM DOS TRÊS ABATES REALIZADOS:



CONSIDERANDO TODO O ESTUDO:

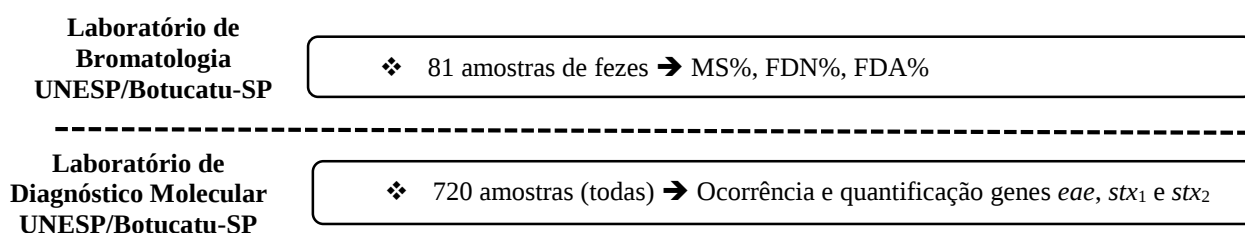


FIGURA 01- Fluxograma de trabalho realizado para a colheita e processamento das amostras obtidas.

4.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS

4.2.1 Amostragem das fezes

No curral da propriedade rural, os animais dos tratamentos foram, individualmente, contidos em tronco de contenção para a colheita das fezes da ampola retal (pré-jejum) utilizando a técnica de palpação retal e embalagens plásticas estéreis.

As amostragens das fezes pós-jejum foram realizadas na sala de abate logo após a inspeção das vísceras gastrointestinais pelo SIF nas mesas de inspeção. O procedimento consistiu no corte longitudinal da porção final do intestino grosso, em alguns casos inclusive do ceco, e na colheita das fezes utilizando embalagens plásticas estéreis individuais.

4.2.2 Amostragem da pele íntegra

A amostragem da pele íntegra antes da esfolia foi realizada na canaleta de sangria utilizando método não destrutivo por esponja umidificada, com adaptações, conforme as instruções da ISO 17604:2003 (ISO, 2003) e do Regulamento (CE) nº 1441/2007 (COMISSÃO EUROPEIA, 2007) para a amostragem de carcaças bovinas.

Da pele de cada bovino foi realizada amostragem de 400 cm² na região do peito, a partir de duas amostragens de 200 cm², uma de cada lado do peito. A cartilagem xifoide do animal foi posicionada na borda caudal do guia de amostragem.

Para realizar cada amostragem foi utilizado uma luva estéril, uma esponja estéril (Dry Sponge - 3M) previamente umidificada com 10 ml de solução salina 0,85% peptonada 0,1% estéril (SSP 0,1%), preparada conforme recomendações da Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003) e um molde estéril de 200 cm², que foi previamente construído com papelão e hastes de madeira de primeiro uso, embalado em papel pardo e autoclavado (121°C por 15 minutos).

4.2.3 Amostragem das meias carcaças esquerdas quentes

As amostragens das meias carcaças esquerdas foram realizadas dentro da câmara de resfriamento logo após o abate. O procedimento de amostragem foi realizado utilizando método não destrutivo por esponja, conforme as instruções da ISO 17604:2003 (ISO, 2003) e do Regulamento (CE) nº 1441/2007 (COMISSÃO EUROPEIA, 2007).

Quatro regiões de cada meia carcaça esquerda foram amostradas: 100 cm² da superfície do coxão, 100 cm² da superfície do flanco, 100 cm² da superfície do peito e 100 cm² da superfície do pescoço, totalizando 400 cm².

Para realizar cada amostragem foi utilizada uma luva estéril, um guia para amostragem estéril de 100 cm² (Interlab) e uma esponja estéril (Dry Sponge - 3M) previamente umidificada com 10 ml de SSP 0,1%.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

4.3.1 Análises microbianas

De cada amostra de fezes foram pesados 25 g em embalagem para homogeneização (400 ml BagLight® PolySilk® - Interscience) e adicionados 225 ml de SSP 0,1% (BRASIL, 2003). As amostras colhidas por esponja foram completadas para o volume final de 25 ml de SSP 0,1% na própria embalagem, conforme recomendações da ISO 17604:2003 (ISO, 2003). Todas as amostras foram homogeneizadas por 60 segundos a 160 batidas por minuto em homogeneizador de amostras (MA 440/CF - Marconi).

Em seguida, as amostras foram individualmente submetidas à diluição seriada em escala decimal utilizando SSP 0,1% estéril, seguido do plaqueamento de três diluições. Todas as amostras (total de 720) foram analisadas para contagem de bactérias aeróbias mesófilas segundo o método AOAC 990.12 (AOAC, 2012a) e ocorrências e contagens de *Escherichia coli* β-glucuronidase positiva (*E. coli* genérica) e de coliformes totais, respectivamente conforme os métodos AOAC 998.08 (AOAC, 2012b) e AOAC 991.14 (AOAC, 2012c), todos utilizando placas 3M™ Petrifilm™.

Os resultados foram classificados em unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) para as amostras de fezes e UFC/cm² para as amostras de pele e de carcaça. Os limites de detecção destas análises foram de 10 UFC/g para as amostras de fezes e de 0,0625 UFC/cm² para as amostras de pele e de carcaça.

4.3.1.1 Preparo das alíquotas para análises moleculares

Durante a execução das análises microbianas (Item 4.3.1), foram reservadas duas alíquotas de 1 g por amostra de fezes e duas alíquotas de 1,5 ml por amostra de pele e

de carcaça. Todas estas alíquotas foram congeladas, transportadas para o Município de Botucatu, SP, e mantidas congeladas (-20°C) até análise.

4.3.1.2 Preparo das alíquotas para análises físico-químicas das fezes

Ainda durante a execução das análises microbianas (Item 4.3.1), o pH de todas as amostras de fezes foi medido, a partir de uma solução homogeneizada de 10 g de fezes com 10 ml de água destilada, utilizando peagômetro de punção direta com termômetro acoplado (Modelo HI 99163 - Hanna Instruments), previamente calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e 7,0 (Merck).

O restante de cada amostra de fezes, quando sobrou, foi congelado, transportado para o Município de Botucatu, SP, e mantido congelado (-20°C) até a realização das análises físico-químicas.

4.3.2 Análises físico-químicas das fezes

Triagem das amostras de fezes foi realizada considerando: as amostras entre o 25º e o 75º percentil dos valores de pH obtidos em cada tratamento; os animais sem amostras perdidas; e as amostras de fezes em quantidade suficiente para as análises físico-químicas. Destas, foram selecionadas aleatoriamente 63 amostras de fezes pós-jejum (21 por tratamento, sendo 7 por abate) e 18 amostras de fezes pré-jejum correspondentes às pós-jejum (6 por tratamento, sendo 2 por abate), totalizando 81 amostras.

Estas foram descongeladas em temperatura ambiente e submetidas à quantificação centesimal da matéria seca (MS) segundo o método AOAC 934.01 (AOAC, 2012d), assim como, da fibra em detergente neutro (FDN) e da fibra em detergente ácido (FDA) segundo os métodos descritos por Van Soest et al. (1991) e modificados por Berchielli et al. (2001), utilizando determinador de fibra (TE-149 - TECNAL).

4.3.3 Análises moleculares

4.3.3.1 *Gene normalizador da etapa de extração do DNA*

O gene *Rep* da região ORF-1 conservada do Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV-2) foi utilizado como gene normalizador da etapa de extração e análise molecular, de modo a validar as extrações realizadas.

Antes da extração, todas as amostras, inclusive dos controles positivo e negativo, foram adicionadas de 15 µl de controle PCV-2 diluído 1:100. Este foi constituído pelo sobrenadante do lisado de cultura de células ST (testículo suíno) infectadas com PCV-2, que foram tratadas com 5% de Vertrell (DuPont®), clarificadas a 10.000 x *g* por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante armazenado a -20°C.

Utilizando análise por qPCR, segundo protocolo descrito por Cruz e Araújo (2014), foram aceitas somente as extrações que apresentaram concentração viral de 4,2±0,2 log cópias/µl.

4.3.3.2 *Extração do DNA das amostras*

As amostras de fezes, ainda congeladas, foram pesadas (0,180 a 0,205 g) utilizando lâminas de bisturi estéreis nº 11 (Solidor) e balança analítica (AG 200 - Gehaka). Logo em seguida, o DNA foi extraído utilizando o kit “QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit – QIAGEN”, com o protocolo “Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection” (“March 2014, QIAamp® Fast DNA Stool Mini Handbook – QIAGEN”).

Cada amostra em SSP 0,1% foi descongelada em gelo e teve exatamente 1,4 ml da amostra, homogeneizado, centrifugado a 10.000 x *g* por 5 minutos (1-15PK - Sigma) e desprezado exatamente 1115 µl do sobrenadante. Logo em seguida, o DNA foi extraído utilizando o kit “illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare”, com o protocolo “Protocol for the purification of genomic DNA from 50-300 µl whole blood and its cell fractions”.

Para ambos os tipos de amostra, o DNA eluído foi dividido em duas alíquotas de 100 µl, que foram armazenadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (Axygen) e congeladas (-20°C), para posteriores análises moleculares.

4.3.3.3 Curvas padrão e controles negativos das análises

A cepa EDL-933 (“hemorrhagic colitis outbreak, Michigan”; PERNA et al., 2001; RILEY et al., 1983) de *E.coli* O157:H7 (positiva para os genes *eae*, *stx*₁ e *stx*₂), e a cepa C-600 (*E. coli* derivada K-12; APPLEBYARD, 1954) de *E. coli* (negativa para estes genes), foram cultivadas em caldo LB [Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani) - BD], conforme Sezonov et al. (2007).

A concentração aproximada destas cepas, em células por mililitro, foi determinada por densidade óptica (DO) a 600 nm utilizando espectrofotômetro (Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech), conforme descrito por Sezonov et al. (2007).

A partir desta aproximação, somente a concentração da cepa EDL-933 foi confirmada pela média da contagem em ágar MacConkey (Difco™ MacConkey Agar - BD), conforme Feng et al. (2016), de 3 diluições e 4 repetições de cada diluição (média final de 5×10^8 UFC/ml). Logo em seguida, ambas as cepas em caldo LB foram divididas em alíquotas de 500 µl, que foram armazenadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (Axygen), centrifugadas a $10.000 \times g$ por 5 minutos, desprezados os sobrenadantes e os “pellets” gerados foram congelados (-20°C).

Para a extração do DNA, os “pellets” foram adicionados de 285 µl de tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4; 0,146 M NaCl; 0,01 M PO₄⁻) e cultivo PCV-2. Após agitação, o DNA foi extraído utilizando o mesmo kit das amostras em SSP 0,1% (item 4.3.3.2), entretanto, a etapa de eluição do DNA foi realizada com 250 µl, de modo que a concentração do controle positivo fosse de 1×10^9 cópias por mililitro (ou 1×10^6 cópias/µl).

Com o intuito de aumentar a solubilidade, todas as diluições preparadas e as amostras analisadas foram previamente aquecidas a 37°C por 15 minutos a 500 rpm (ThermoMixer C - Eppendorf).

A partir dos resultados da triagem (item 4.3.3.4), as amostras negativas para os três genes alvo foram utilizadas na elaboração de três curvas padrão para a cepa EDL-933 (controle positivo), específicas para cada tipo de matriz analisada (fezes, pele e carcaça). Em adição, também foi preparada uma curva padrão utilizando somente meio eluente (kit illustra™), de modo que as possíveis interferências das matrizes nos resultados das análises pudessem ser monitoradas. As curvas padrão foram preparadas a

partir de seis diluições seriadas de 1:10 (6 pontos), até se obter a concentração de 1×10^3 cópias/ml (ou 1×10^0 cópias/ μ l).

4.3.3.4 Análises qualitativas e quantitativas das amostras

Todas as análises de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) com o 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems).

Estas análises tiveram a mistura de reação com volume final de 20 μ l, sendo destes, 10 μ l de GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega) e 4,0 μ l de amostra (DNA extraído). A concentração dos iniciadores (“primers”) dessalinizados (Sigma-Aldrich[®]), teve variação dependendo do gene alvo (Tabela 02).

A programação utilizada consistiu em 95°C por 10 minutos (desnaturação inicial), seguido por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 60 segundos (transcrição). Sendo ao final, determinada a curva de dissociação (“melting”), por meio da detecção da fluorescência do “SYBR green” (intercalante de DNA) durante aumento gradual de temperatura entre 60 e 95°C.

A primeira etapa consistiu na análise qualitativa das amostras (triagem). Cada análise de qPCR foi composta por 90 amostras, mais as duas últimas diluições com fluorescência detectável (“endpoint”) do controle positivo EDL-933, em duplicata, assim como, uma do controle negativo C-600 (utilizando a mesma diluição do controle positivo) e um controle negativo somente com água “Nuclease-Free” (Promega).

Para garantir a especificidade, as amostras com pico de dissociação (T_m) fora da variação $\pm 1^\circ\text{C}$ em relação ao T_m médio do controle positivo foram consideradas negativas para o gene alvo em questão. Com relação a sensibilidade, o C_t (“cycle threshold”) das reações foi obtido a partir do “threshold level” estabelecido automaticamente pelo programa para cada análise. Assim sendo, as amostras com C_t maior que o “Ct endpoint” do controle positivo foram consideradas negativas para o gene alvo.

TABELA 02– Descrição dos iniciadores utilizados (“primers”)

Parâmetros	Sequência “Primer” (5’-3’)	Tamanho “Amplicon”	Referência	Concentração
Gene <i>Rep</i> (ORF-1 / PCV-2) ¹				
“Forward primer”	GAT GAT CTA CTG AGA CTG TGT GA	152pb	Ladekjaer-Mikkelsen et al. (2002)	0,25 µM
“Reverse primer”	AGA GCT TCT ACA GCT GGG ACA			
Gene <i>eae</i> (<i>E. coli</i> EPEC)				
“Forward primer”	ACT GGA CTT CTT ATT RCC GTT CTA TG	189pb	Hardegen et al. (2010)	0,25 µM
“Reverse primer”	CCT AAA CGG GTA TTA TCA CCA GA			
Gene <i>stx</i> ₁ (<i>E. coli</i> STEC)				
“Forward primer”	AGT CGT ACG GGG ATG CAG ATA AAT	418pb	Bellin et al. (2001)	0,15 µM
“Reverse primer”	CCG GAC ACA TAG AAG GAA ACT CAT			
Gene <i>stx</i> ₂ (<i>E. coli</i> STEC)				
“Forward primer”	GAT GTT TAT GGC GGT TTT ATT TGC	83pb	Yoshitomi et al. (2006)	0,15 µM
“Reverse primer”	TGG AAA ACT CAA TTT TAC CTT TAG CA			

¹ Gene normalizador utilizado.

As amostras positivas na triagem foram submetidas a quantificação (segunda etapa). Cada análise de qPCR quantitativa foi composta por 68 amostras, mais duas curvas padrão de seis pontos, ambas em duplicata, do controle positivo EDL-933, com e sem a interferência da matriz avaliada (item 4.3.3.3). Assim como, um controle negativo formado pela mistura (“pool”) de amostras negativas (triagem), um controle negativo C-600 e um controle negativo com água “Nuclease-Free” (Promega). Para cada tipo de amostra, também foi adicionado um controle positivo formado pela amostra com menor C_t dentre as demais (triagem) para o respectivo gene alvo.

Independente do gene alvo e do tipo de matriz (fezes, pele e carcaça), não houve diferenças no coeficiente de determinação (R^2) e no coeficiente angular (“slope”), ou eficiência da reação [$Eff\% = (-1 + 10^{(-1/slope)}) \times 100$], entre as curvas padrão com e sem a adição da matriz negativa. Assim sendo, as curvas padrão preparadas com amostras negativas, para cada tipo de matriz avaliada, foram adotadas como referência para a quantificação das amostras positivas.

Todas as análises tiveram curva padrão com $R^2 > 0,99$ e a eficiência da reação situou-se entre 90 e 95% para os genes *stx2* e *eae*, entretanto, entre 80 e 85% para o gene *stx1*, independentemente do tipo de amostra. Além disso, foram utilizados os mesmos critérios de especificidade e sensibilidade adotados na triagem para a reavaliação dos resultados positivos na quantificação.

A partir da quantidade inicial de amostra, os resultados finais foram ajustados para cópias/g para as amostras de fezes e cópias/cm² para as amostras de pele e de carcaça. Os limites de detecção destas análises foram de 3,18 log cópias/g para as amostras de fezes e de 0,35 log cópias/cm² para as amostras de pele e de carcaça.

4.4 PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

O processamento estatístico dos dados foi supervisionado pela Prof^a. Dr^a. Luzia Aparecida Trinca, do Departamento de Bioestatística – DB/IBB/UNESP, Botucatu, SP.

O tamanho amostral aproximado de 60 foi previamente estabelecido para este estudo utilizando a fórmula “ $n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot 2 \cdot \sigma^2 / d^2$ ”, em que: $Z_{\alpha/2} = 1,96$ (distribuição Normal para $\alpha = 0,05$; probabilidade do erro tipo I), $Z_{\beta} = 0,84$ (distribuição Normal para $\beta = 0,2$; probabilidade do erro tipo II), $\sigma^2 = 1,0 \log_{10}$ (variância populacional) e $d = 0,5 \log_{10}$ (diferença detectável).

Todas as análises foram realizadas no software estatístico SAS versão 9.4 (TS Level 1M2) considerando um nível de significância de 5% de probabilidade.

Devido a limitações operacionais, foi necessário a execução de três replicações do experimento com 20 animais por tratamento ($n=20$) para se obter o tamanho amostral proposto ($n=60$). Em vista disso, o efeito “dia de abate” foi considerado efeito aleatório. Nele estão contidas, por exemplo, as variabilidades dos diferentes lotes de bovinos, das condições climáticas e de outras intercorrências pontuais à cada dia de abate.

Com o objetivo de reduzir a variabilidade individual da unidade experimental, as amostragens das fezes foram realizadas em todos os animais antes e após a execução dos tratamentos. Portanto, o efeito “momento de colheita” foi considerado medida repetida e efeito aleatório nos modelos estatísticos utilizados.

As variáveis resposta com frequentes resultados abaixo do limite de detecção analítico foram analisadas de três formas: primeiro, como variáveis binárias utilizando todos os resultados, sendo presença=1 e ausência=0; segundo, como variáveis quantitativas utilizando somente os resultados positivos obtidos; e terceiro, como variáveis quantitativas utilizando todos os resultados, sendo adotado o valor “0” (zero) para os resultados abaixo do limite de detecção analítico.

4.4.1 Variáveis quantitativas

As variáveis quantitativas foram submetidas à análises de variância e à regressão utilizando o procedimento Proc Mixed (SAS Institute, Cary, NC, USA), com “tempo de jejum” como efeito fixo, “dia de abate” como efeito aleatório e “animal” como unidade experimental. Além disso, para as variáveis fecais foi adicionado “momento de colheita” como medida repetida (com estrutura de covariância autoregressivo de primeira ordem). “Kenward-Roger” foi utilizado para determinar os graus de liberdade e “Tukey-Kramer” para ajustar as comparações múltiplas.

Todas as análises de regressão foram testadas desde a função quadrática.

Análise dos resíduos foi realizada para validar o modelo à cada variável e atender aos requisitos de normalidade e homocedasticidade. Neste sentido, para a realização das análises estatísticas, os resultados obtidos a partir das análises microbianas e moleculares das amostras de fezes e de pele foram transformados em escala logarítmica de base 10 por apresentarem melhor ajuste ao modelo proposto.

Para cada variável analisada, quando significativo ($P < 0,05$), optou-se pela apresentação dos resultados da análise de regressão em relação aos da análise de variância, devido ao maior valor biológico da mesma.

4.4.2 Variáveis binárias

As variáveis binárias foram submetidas à análises logísticas com “Odds Ratio” utilizando o procedimento Proc Glimmix (SAS Institute, Cary, NC, USA), com os mesmos efeitos e ajustes descritos para as variáveis quantitativas. Predição linear marginal (“noblup”) adicionada da fórmula “ $y = \exp(x)/[1 + \exp(x)]$ ” foi utilizada para calcular as ocorrências estimadas e os respectivos intervalos de confiança com 95% de probabilidade.

5 RESULTADOS

5.1 EXCREÇÃO FECAL DE INDICADORES HIGIÊNICO-SANITÁRIOS E DE STEC E EPEC

5.1.1 Características físico-químicas das fezes

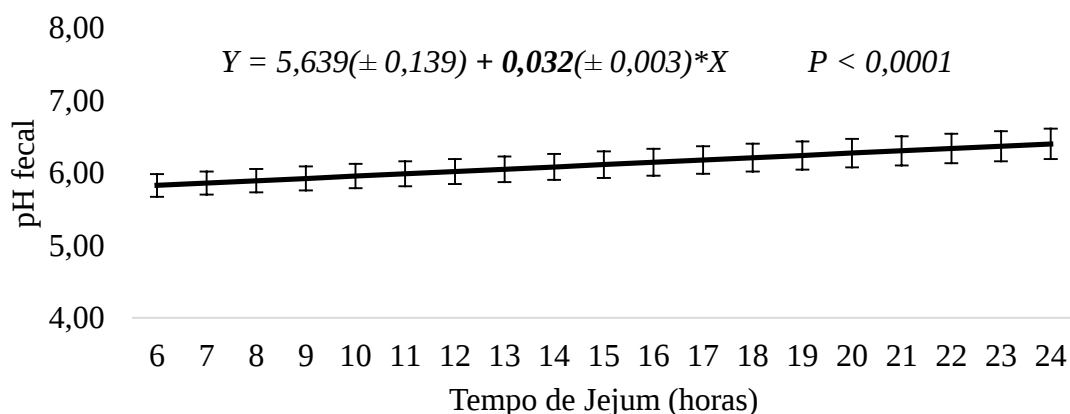


FIGURA 02 - Equação preditiva, com erro padrão, do pH fecal de bovinos considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos.

Sendo: “Y”, o valor do pH fecal, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P < 0,0001$) que o pH das fezes foi de $5,83 \pm 0,16$ nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e aumentou 0,03 unidade a cada hora adicional (**taxa de aumento linear**), sendo de $6,40 \pm 0,21$ nos bovinos com 24 horas (Figura 02).

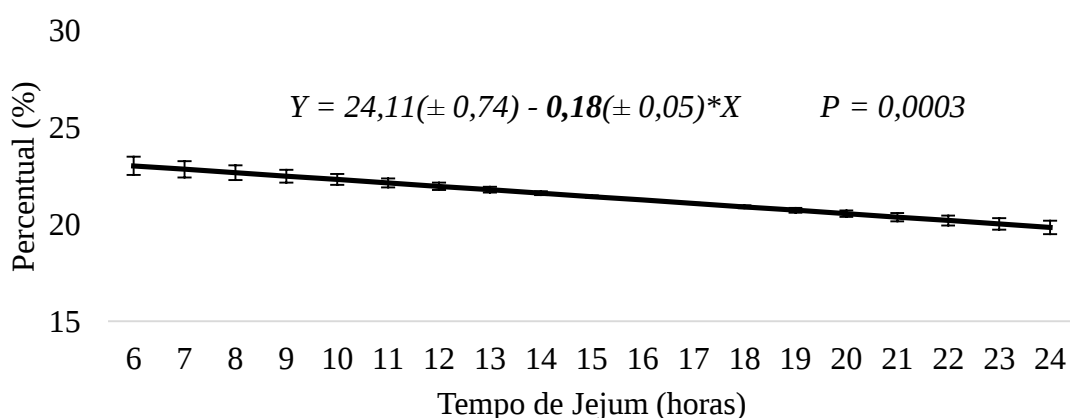


FIGURA 03 - Equação preditiva, com erro padrão, do percentual de matéria seca (MS%) das fezes de bovinos considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos.

Sendo: “Y”, o valor do percentual de matéria seca (MS%) das fezes, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P = 0,0003$) que o percentual de matéria seca (MS%) das fezes foi de $23,05 \pm 0,47\%$ nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e reduziu $0,18\%$ a cada hora adicional (**taxa de redução linear**), sendo de $19,86 \pm 0,35\%$ nos bovinos com 24 horas (Figura 03).

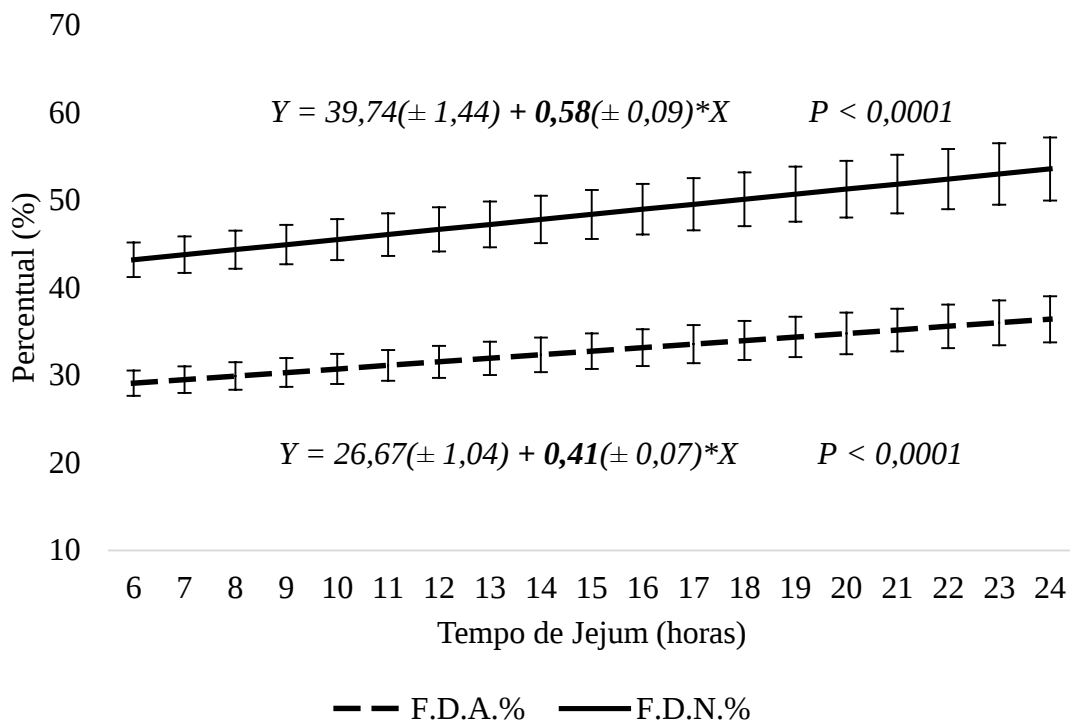


FIGURA 04 - Equação preditiva, com erro padrão, dos percentuais de fibra em detergente neutro (FDN%) e ácido (FDA%) das fezes de bovinos considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos.

Sendo: “Y”, o valor percentual da referida fibra, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P < 0,0001$) que os percentuais de fibra em detergente neutro (FDN%) e ácido (FDA%) das fezes foram respectivamente de $43,20 \pm 1,98\%$ e $29,10 \pm 1,44\%$ nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e aumentaram $0,58\%$ e $0,41\%$ (**taxas de aumento linear**) a cada hora adicional, sendo de $53,56 \pm 3,61\%$ e $36,40 \pm 2,63\%$ nos bovinos com 24 horas, respectivamente (Figura 04).

5.1.2 Excreção fecal de indicadores higiênico-sanitários

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P < 0,0001$) que a contagem de bactérias aeróbias mesófilas das fezes foi de $7,74 \pm 0,25$ log UFC/g nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e reduziu $0,02$ log UFC/g/hora a cada hora

adicional (**taxa de redução linear**), sendo de $7,40 \pm 0,18$ log UFC/g nos bovinos com 24 horas (Figura 05).

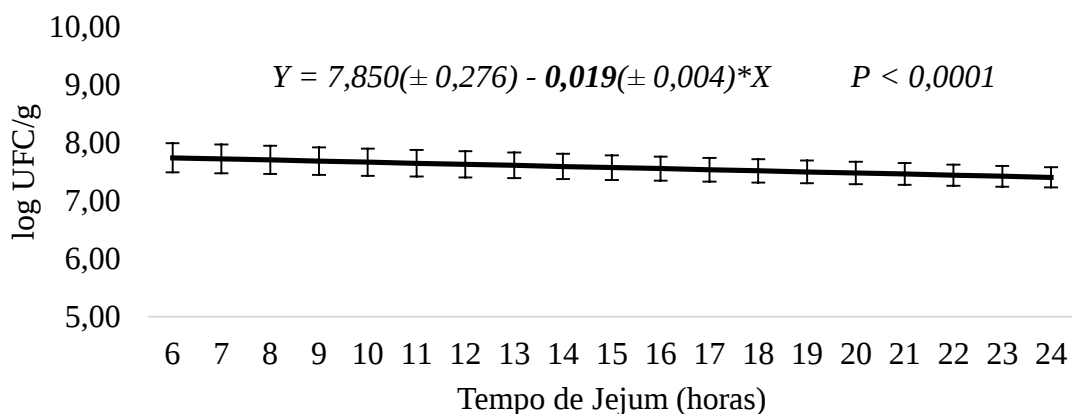


FIGURA 05 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de bactérias aeróbias mesófilas das fezes dos bovinos, considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos. Sendo: “Y”, a contagem em log UFC/g de bactérias aeróbias mesófilas das fezes, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

A concentração de *E. coli* genérica nas fezes permaneceu constante, independentemente do tempo de jejum, entretanto, a concentração de coliformes totais diferiu entre os bovinos com 6 e 12 horas de jejum pré-abate (sutil redução), conforme Figura 06.

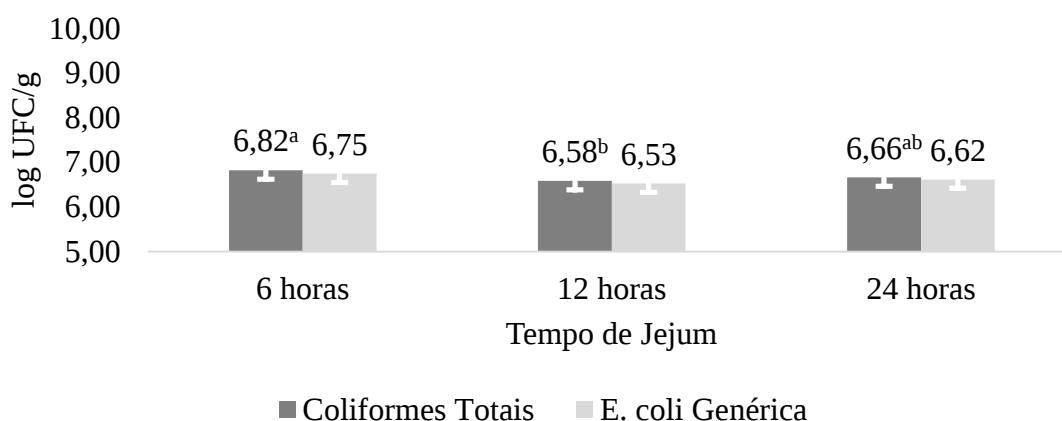


FIGURA 06 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio das contagens de *E. coli* genérica e coliformes totais nas fezes de bovinos submetidos à diferentes períodos de jejum pré-abate.

^{a,b,c} Valores com letras distintas para o mesmo indicador são diferentes ($P < 0,05$).

5.1.3 Excreção fecal de STEC e EPEC

Não foram detectadas diferenças ($P > 0,05$) nas ocorrências de STEC (stx_1 e stx_2) e EPEC (Tabela 03), assim como, na quantificação de EPEC (Tabela 04) nas fezes dos bovinos submetidos à diferentes tempos de jejum pré-abate.

TABELA 03 - Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de STEC e EPEC nas fezes dos bovinos

Parâmetros	Tempo de Jejum			Valor P
	6 horas	12 horas	24 horas	
EPEC (eae)	15,83 (9,51 – 25,19)	22,5 (14,86 – 32,56)	24,42 (16,43 – 34,69)	0,3541
STEC (stx_1)	17,32 (8,76 – 31,94)	22,31 (11,98 – 38,28)	27,59 (15,46 – 44,47)	0,3144
STEC (stx_2)	6,67 (3,01 – 14,13)	9,17 (4,68 – 17,19)	14,25 (8,38 – 23,19)	0,2412

TABELA 04 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio da contagem de EPEC nas fezes dos bovinos

Parâmetros	Tempo de Jejum			EPM*	Valor P
	6 horas	12 horas	24 horas		
log cópias/g					
EPEC (eae)	0,63	0,98	0,98	0,19	0,2960
#EPEC (eae)	3,91	4,30	4,01	0,17	0,2218

* Erro padrão médio.

Considerando somente os resultados positivos.

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P = 0,0306$ e $P = 0,0023$) que as contagens de STEC (stx_1) nas fezes, considerando ou não os resultados negativos, foram respectivamente de $0,63 \pm 0,38$ e $3,80 \pm 0,23$ log cópias/g nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e aumentaram 0,03 log cópias/g (**mesma taxa de aumento linear**) a cada hora adicional, sendo de $1,21 \pm 0,64$ e $4,37 \pm 0,40$ log cópias/g nos bovinos com 24 horas, respectivamente (Figura 07).

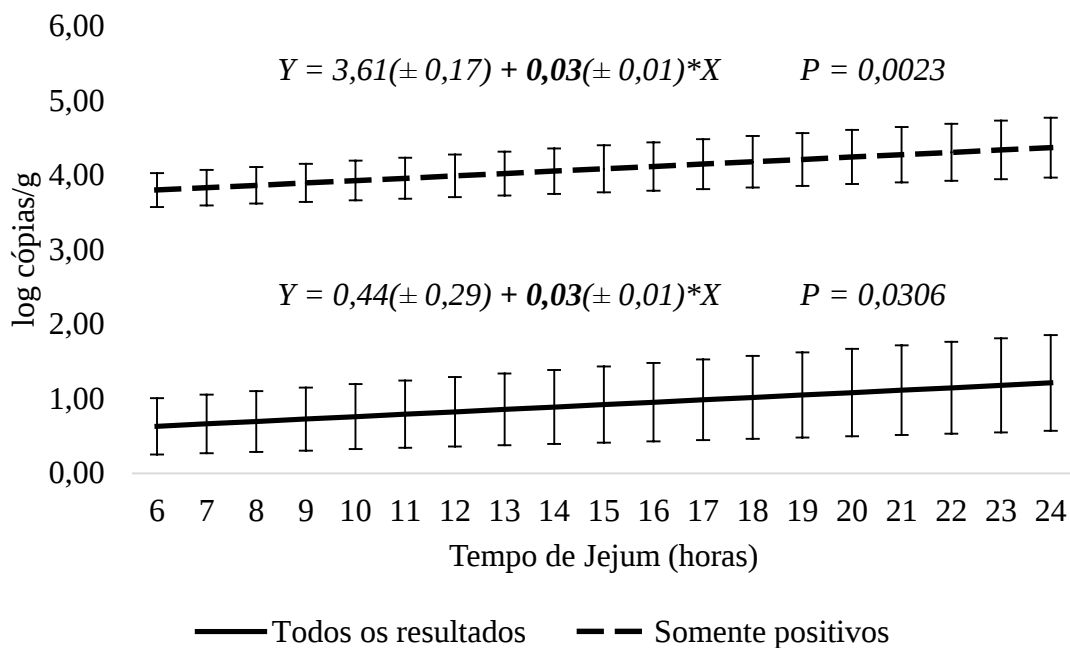


FIGURA 07 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de STEC (stx_1) das fezes, considerando ou não os resultados negativos, em relação ao tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos.

Sendo: “Y”, a contagem média em log cópias/g de STEC (stx_1) das fezes, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

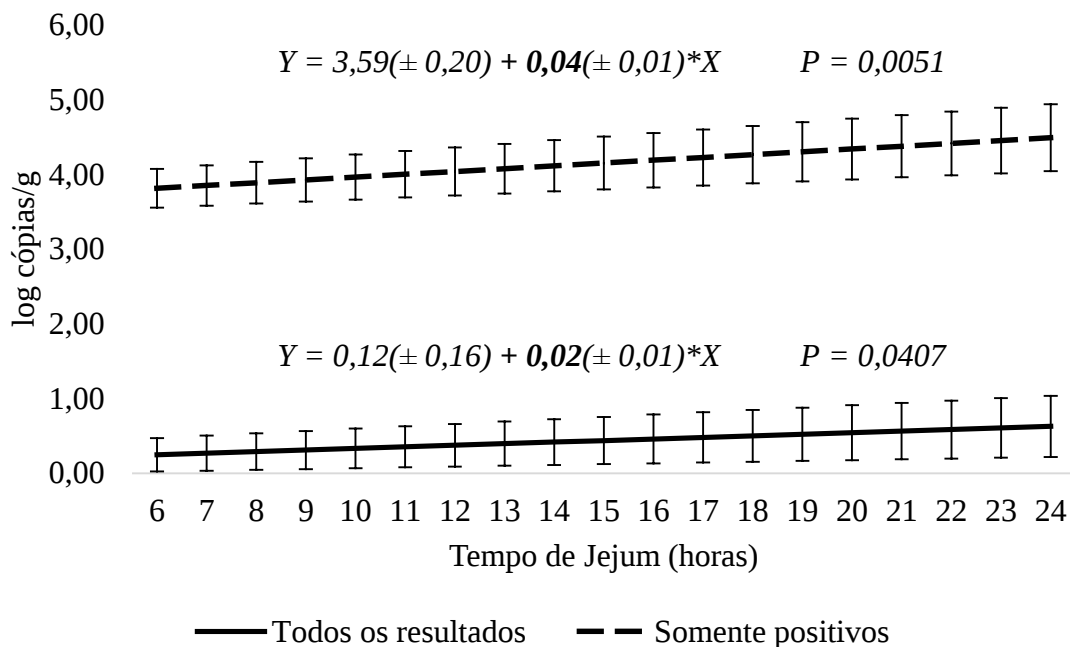


FIGURA 08 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de STEC (stx_2) das fezes, considerando ou não os resultados negativos, em relação ao tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos.

Sendo: “Y”, a contagem média em log cópias/g de STEC (stx_2) das fezes, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P = 0,0407$ e $P = 0,0051$) que as contagens de STEC (*stx*₂) nas fezes, considerando ou não os resultados negativos, foram respectivamente de $0,25 \pm 0,22$ e $3,81 \pm 0,26$ log cópias/g nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e aumentaram 0,02 e 0,04 log cópias/g (**taxas de aumento linear**) a cada hora adicional, sendo de $0,63 \pm 0,41$ e $4,49 \pm 0,45$ log cópias/g nos bovinos com 24 horas, respectivamente (Figura 08).

5.2 CONTAMINAÇÃO DA PELE DOS BOVINOS

5.2.1 Indicadores higiênico-sanitários

Não foram detectadas diferenças entre os tratamentos para nenhum dos indicadores higiênico-sanitários avaliados na pele da região do peito dos bovinos antes do processo de esfolagem (Tabela 05).

TABELA 05 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio dos parâmetros avaliados na pele da região do peito dos bovinos

Parâmetros log UFC/cm ²	Tempo de Jejum			EPM*	Valor <i>P</i>
	6 horas	12 horas	24 horas		
Aeróbios mesófilos	5,14	5,29	5,04	0,17	0,0786
<i>E. coli</i> genérica	1,92	2,09	1,94	0,28	0,3635
Coliformes totais	2,02	2,17	2,04	0,29	0,4462

* Erro padrão médio.

5.2.2 STEC e EPEC

TABELA 06 - Razão de Chances (“Odds Ratio”), com Intervalo de Confiança (95%), de EPEC e STEC na pele da região do peito dos bovinos

Parâmetro	Comparação	Razão de Chances	IC 95%	Valor <i>P</i>
EPEC (<i>eae</i>)	12 h vs. 6 h	2,42	(0,80-7,34)	0,0162
	24 h vs. 6 h	5,16*	(1,67-15,95)	
	24 h vs. 12 h	2,13	(0,81-5,58)	
STEC (<i>stx</i> ₁)	12 h vs. 6 h	1,82	(0,61-5,40)	0,0021
	24 h vs. 6 h	7,82*	(2,40-25,48)	
	24 h vs. 12 h	4,31*	(1,44-12,90)	
STEC (<i>stx</i> ₂)	12 h vs. 6 h	4,30	(0,45-40,78)	0,3134
	24 h vs. 6 h	5,68	(0,59-54,87)	
	24 h vs. 12 h	1,32	(0,30-5,84)	

* São significativas as comparações com o número 1 ausente no Intervalo de Confiança (95%).

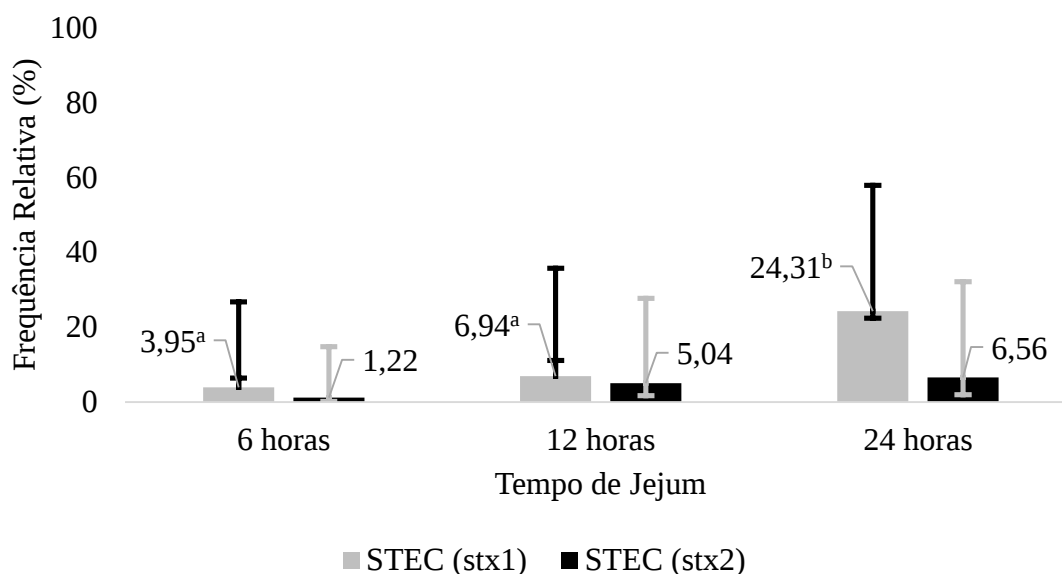


FIGURA 09 – Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de STEC (*stx*₁ e *stx*₂) na pele da região do peito dos bovinos.

^{a,b,c} Valores com letras distintas para o mesmo patógeno (gene) são diferentes ($P < 0,05$).

A extensão do tempo de jejum pré-abate de 12 para 24 horas resultou em maior contaminação da pele na região do peito por STEC (*stx*₁), conforme Figura 09. Além disso, as peles dos bovinos submetidos à 12 e 24 horas de jejum pré-abate apresentam, respectivamente, 4,3 e 7,8 vezes maiores chances de serem contaminadas por STEC (*stx*₁) do que às dos bovinos com 6 horas (Tabela 06).

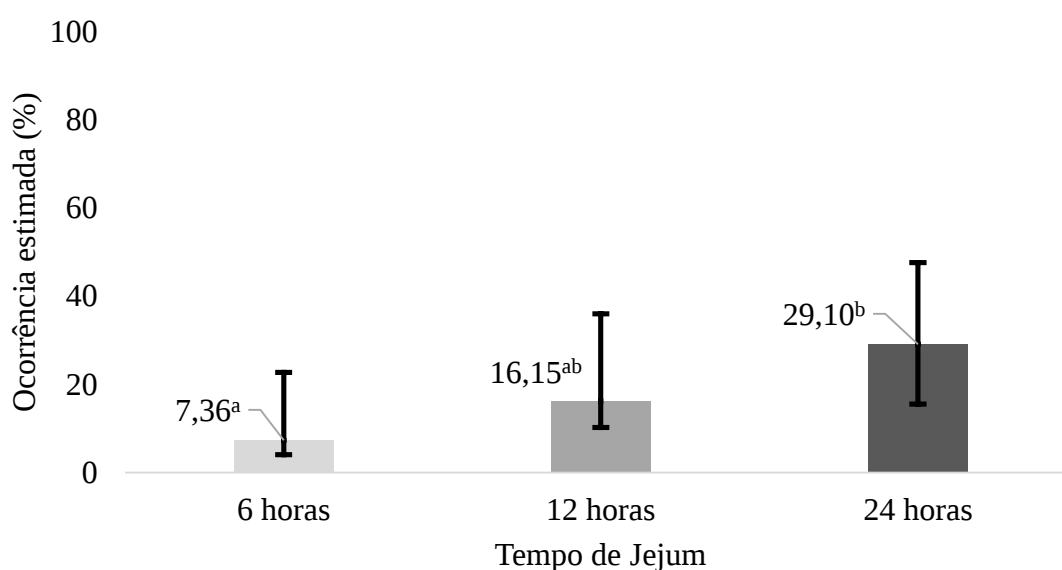


FIGURA 10 - Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de EPEC (*eae*) na pele da região do peito dos bovinos.

^{a,b,c} Valores com letras distintas são diferentes ($P < 0,05$).

A extensão do tempo de jejum pré-abate de 6 para 24 horas resultou em maior contaminação da pele na região do peito por EPEC, conforme Figura 10. Além disso, as peles dos bovinos submetidos à 24 horas de jejum pré-abate apresentaram 5,2 vezes maior chance de serem contaminadas por EPEC do que às dos bovinos com 6 horas (Tabela 06).

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P = 0,0073$) que a contagem de EPEC na pele da região do peito, considerando todos os resultados, foi de $0,15 \pm 0,21$ log cópias/cm² nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e aumentou $0,02$ log cópias/cm² a cada hora adicional (**taxa de aumento linear**), sendo de $0,42 \pm 0,31$ log cópias/cm² nos bovinos com 24 horas (Figura 11).

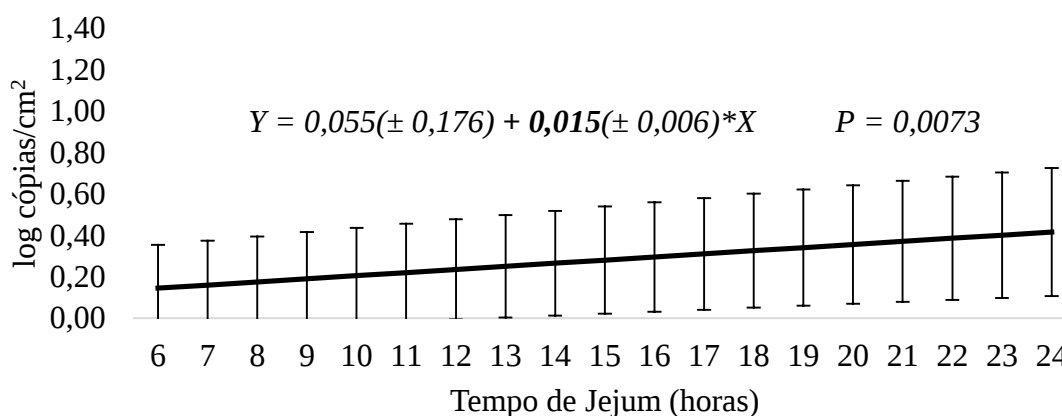


FIGURA 11 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de EPEC na pele da região do peito considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos. Sendo: “Y”, a contagem em log cópias/cm² de EPEC na pele, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P = 0,0012$) que a contagem de STEC (stx_1) na pele da região do peito, considerando todos os resultados, foi de $0,20 \pm 0,31$ log cópias/cm² nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e aumentou $0,02$ log cópias/cm² a cada hora adicional (**taxa de aumento linear**), sendo de $0,57 \pm 0,42$ log cópias/cm² nos bovinos com 24 horas (Figura 12).

Não foi detectada diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) considerando somente os resultados positivos para EPEC e STEC (stx_1) na pele da região do peito dos bovinos. Assim como, para o STEC (stx_2), considerando ou não os resultados negativos (Tabela 07).

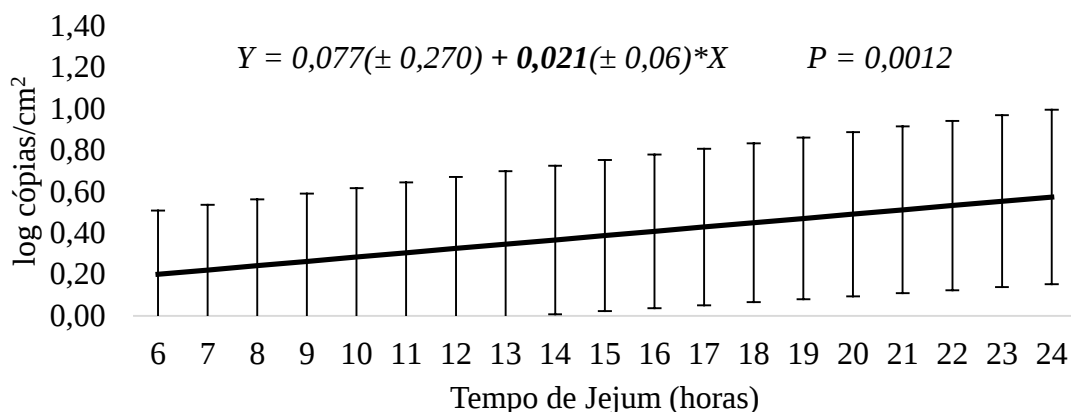


FIGURA 12 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de STEC (stx_1) na pele da região do peito considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos. Sendo: “Y”, a contagem em log cópias/cm² de STEC (stx_1) na pele, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

TABELA 07 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio das contagens de STEC e EPEC na pele da região do peito dos bovinos

Parâmetro log cópias/cm ²	Tempo de Jejum			EPM*	Valor P
	6 horas	12 horas	24 horas		
#EPEC (<i>eae</i>)	0,81	1,34	1,25	0,30	0,2001
#STEC (stx_1)	0,98	1,57	1,49	0,42	0,1046
STEC (stx_2)	0,01	0,06	0,07	0,03	0,1992
#STEC (stx_2)	0,57	0,95	0,86	0,18	0,4932

* Erro padrão médio.

Considerando somente os resultados positivos.

5.3 CONDIÇÃO HIGIÊNICA E SANITÁRIA DAS CARCAÇAS

5.3.1 Falhas sanitárias operacionais durante o processo de evisceração

TABELA 08 - Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de bovinos com ruptura do TGI e/ou com desvio ao DIF durante o processo de abate

Parâmetros	Tempo de Jejum			Valor P
	6 horas	12 horas	24 horas	
Ruptura do TGI, %	14,52 (6,95 – 36,81)	5,57 (2,06 – 20,89)	5,54 (2,01 – 20,65)	0,1185
Desvio ao DIF, %	4,26 (1,88 – 30,97)	2,05 (0,67 – 21,10)	1,00 (0,19 – 15,91)	0,3801

Embora bovinos com 6 horas de jejum pré-abate tenham apresentado descritivamente maiores ocorrências de rupturas do trato gastrointestinal (TGI) e de

desvios ao Departamento de Inspeção Final (DIF) durante o processo de abate (Tabela 08), estas diferenças não foram detectadas estatisticamente ($P > 0,05$).

5.3.2 Indicador higiênico-sanitário: bactérias aeróbias mesófilas

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P < 0,0001$) que a contagem de bactérias aeróbias mesófilas na superfície das carcaças foi de $1,57 \pm 0,17$ log UFC/cm² nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e aumentou 0,02 log UFC/cm² a cada hora adicional (**taxa de aumento linear**), sendo de $1,90 \pm 0,25$ log UFC/cm² nos bovinos com 24 horas (Figura 13).

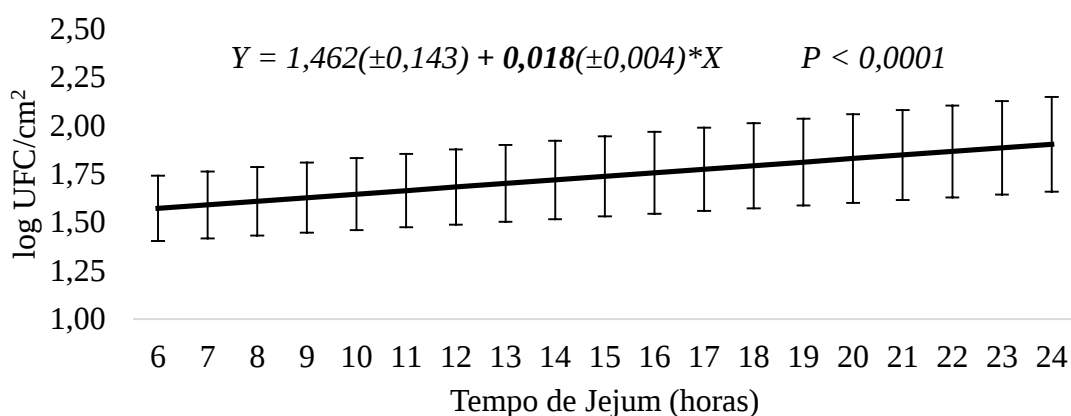


FIGURA 13 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de bactérias aeróbias mesófilas na superfície de carcaças considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos. Sendo: “Y”, a contagem em log UFC/cm² de bactérias aeróbias mesófilas na carcaça, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

5.3.3 Indicadores higiênico-sanitários: *E. coli* genérica e coliformes totais

A extensão do tempo de jejum pré-abate de 6 para 12 horas resultou em aumento da ocorrência do indicador *E. coli* genérica, na superfície das carcaças (Figura 14). As carcaças dos bovinos submetidos à 12 e 24 horas apresentaram, respectivamente, 2,9 e 5,0 vezes maiores chances de serem contaminadas com *E. coli* genérica, em relação às carcaças dos bovinos com 6 horas (Tabela 09).

A extensão de 6 para 24 horas também resultou na maior ocorrência do indicador coliformes totais na superfície das carcaças (Figura 14), o que representou 2,3 vezes maiores chances de serem contaminadas por este indicador (Tabela 09).

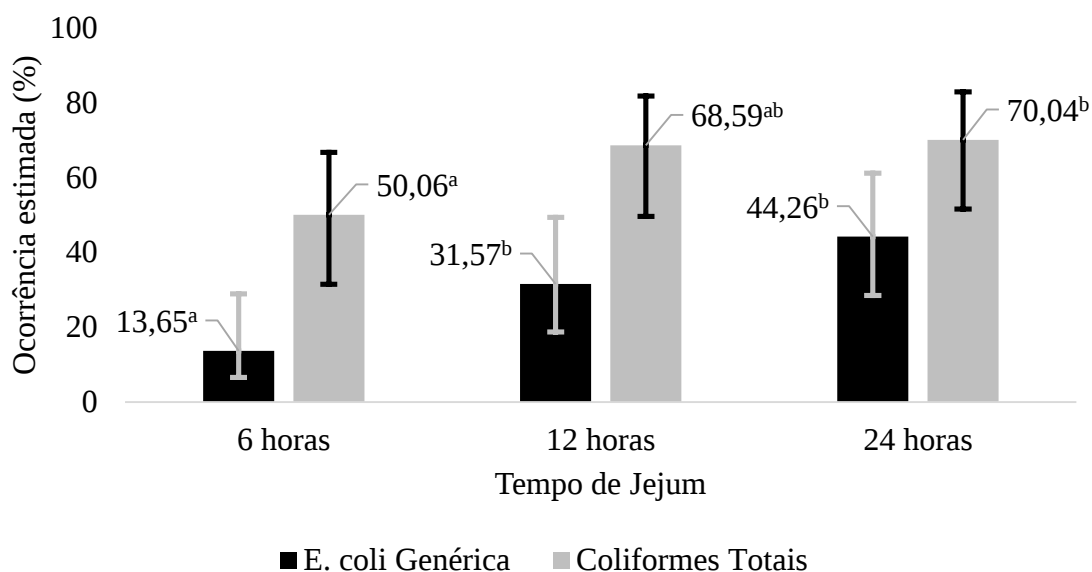


FIGURA 14 - Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de *E. coli* genérica e coliformes totais na superfície das carcaças.

^{a,b,c} Valores com letras distintas para o mesmo indicador são diferentes ($P < 0,05$).

TABELA 09 - Razão de Chances (“Odds Ratio”), com Intervalo de Confiança (95%), de *E. coli* genérica e coliformes totais na superfície das carcaças

Parâmetro	Comparação	Razão de Chances	IC 95%	Valor <i>P</i>
<i>E. coli</i>	12 h vs. 6 h	2,92*	(1,09-7,84)	0,0049
	24 h vs. 6 h	5,02*	(1,91-13,20)	
	24 h vs. 12 h	1,72	(0,76-3,89)	
Coliformes totais	12 h vs. 6 h	2,18	(0,99-4,77)	0,0572
	24 h vs. 6 h	2,33*	(1,07-5,09)	
	24 h vs. 12 h	1,07	(0,48-2,39)	

* São significativas as comparações com o número 1 ausente no Intervalo de Confiança (95%).

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P = 0,0009$) que a contagem de *E. coli* genérica na superfície das carcaças foi de $0,02 \pm 0,03$ UFC/cm² nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e aumentou $0,003$ UFC/cm² a cada hora adicional (**taxa de aumento linear**), sendo de $0,06 \pm 0,04$ UFC/cm² nos bovinos com 24 horas (Figura 15).

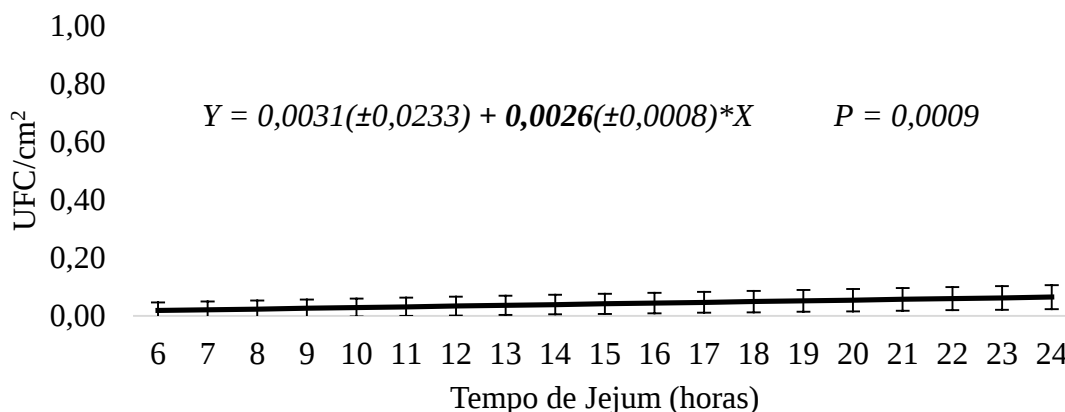


FIGURA 15 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de *E. coli* genérica na superfície das carcaças considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos. Sendo: “Y”, a contagem em UFC/cm² de *E. coli* genérica na carcaça, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

Nas condições estabelecidas por este estudo, foi possível constatar ($P = 0,0012$) que a contagem de coliformes totais na superfície das carcaças foi de $0,16 \pm 0,16$ UFC/cm² nos bovinos com 6 horas de jejum pré-abate e aumentou 0,01 UFC/cm² a cada hora adicional (**taxa de aumento linear**), sendo de $0,36 \pm 0,22$ UFC/cm² nos bovinos com 24 horas (Figura 16).

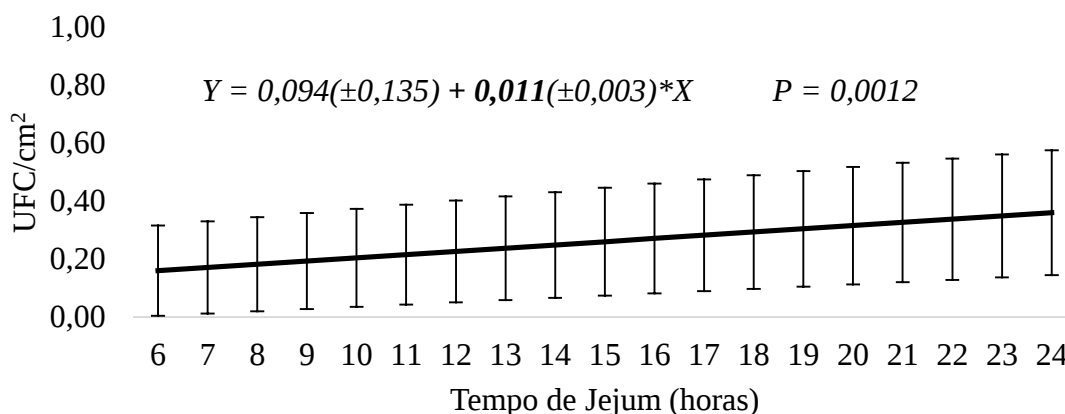


FIGURA 16 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de coliformes totais na superfície de carcaças considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos. Sendo: “Y”, a contagem em UFC/cm² de coliformes totais na carcaça, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

Não foi detectada diferença entre os tratamentos considerando somente os resultados positivos para *E. coli* genérica e coliformes totais na superfície das carcaças (Tabela 10).

TABELA 10 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio das contagens de *E. coli* genérica e coliformes totais na superfície das carcaças

Parâmetro UFC/cm ²	Tempo de Jejum			EPM*	Valor <i>P</i>
	6 horas	12 horas	24 horas		
# <i>E. coli</i> genérica	0,09	0,11	0,14	0,03	0,3555
#Coliformes totais	0,31	0,34	0,45	0,15	0,2407

* Erro padrão médio.

Considerando somente os resultados positivos.

5.3.4 STEC e EPEC

Todas as amostragens realizadas nas carcaça tiveram resultado abaixo do limite de detecção da qPCR ($< 0,35 \log$ cópias/cm²) para STEC (*stx*₁ e *stx*₂) e EPEC (*eae*).

6 DISCUSSÃO

6.1 EXCREÇÃO DE INDICADORES HIGIÊNICO-SANITÁRIOS

O tempo de jejum pré-abate no presente estudo caracterizou-se por total jejum alimentar e somente as duas primeiras horas também por jejum hídrico. A extensão do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas ocasionou redução do teor de MS% (Figura 03) e aumento dos teores de FDN% e FDA% (Figura 04) das fezes dos bovinos. Estes resultados estão relacionados com a degradação de carboidratos e proteínas solúveis pela microbiota do trato gastrointestinal (TGI) e a absorção pelo animal dos produtos do metabolismo microbiano (BERCHIELLI et al., 2011), o que resultou no decréscimo do teor de MS%, conforme também verificado por Gregory et al. (2000) e Jacobson et al. (2002), e na concentração dos teores de FDN% e FDA%, que são compostos essencialmente por carboidratos estruturais e proteínas insolúveis, cujas degradações pela microbiota constituem-se em processos lentos e complexos (BERCHIELLI et al., 2011).

A extensão do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas também resultou na gradual elevação do pH fecal (Figura 02). Dentre outros fatores, o pH do TGI está relacionado à concentração dos ácidos orgânicos voláteis (AOV) presentes, tais como, acético, propiônico, butírico e lático, que são produtos do metabolismo microbiano e a principal fonte de energia para os animais ruminantes (BERCHIELLI et al., 2011). Portanto, durante o jejum alimentar provavelmente ocorreu a absorção de AOV com consequente aumento do pH fecal (CALLAWAY et al., 2013a; POINTON et al., 2012).

O decréscimo de aeróbios mesófilos nas fezes ao longo do jejum alimentar (Figura 05) pode estar relacionado com a menor disponibilidade de nutrientes para a manutenção da microbiota, principalmente no intestino grosso (BERCHIELLI et al., 2011). Entretanto, Gregory et al. (2000) verificou aumento de aeróbios mesófilos nas fezes em bovinos *Bos tauros* (Angus) criados em pastagem e submetidos à 42 horas de jejum alimentar, sendo: 24 h na baía, 2 h de transporte e mais 16 h de curral de abate. Esta discordância pode estar relacionada com diferenças na dieta, uma vez que os animais do presente estudo receberam dieta com 30% de volumoso e 70% de concentrado, a qual apresenta maior taxa fermentativa ruminal e biodisponibilidade, e menor produção de fezes (BERCHIELLI et al., 2011).

Conforme explanado por Callaway et al. (2013a) e Pointon et al. (2012), os principais limitantes à proliferação de *E. coli* genérica e *E. coli* O157:H7 no TGI de

bovinos são o baixo pH e a alta concentração de AOV devido a sua citotoxicidade. Portanto, a porção final do intestino grosso constitui-se no principal local de colonização e multiplicação de *E. coli* O157:H7, devido ao pH mais elevado e à menor concentração de AOV (GRAUKE et al., 2002; CALLAWAY et al., 2013a).

Por este motivo, a extensão do jejum alimentar tem sido associada ao aumento da concentração gastrointestinal de enterobactérias e *E. coli* genérica (GREGORY et al., 2000; CALLAWAY et al., 2013a), assim como, à maior ocorrência e concentração intestinal de *E. coli* O157:H7 (BUCHKO et al., 2000; CALLAWAY et al., 2013a; POINTON et al., 2012).

Entretanto, no presente estudo, a extensão do jejum pré-abate entre 6 e 24 horas não influenciou na concentração de *E. coli* genérica e pouco alterou a excreção de coliformes totais (Figura 06). Por outro lado, houve aumento do pH fecal (Figura 02), indicando possível redução de AOV, o que deveria resultar em maior concentração destes indicadores nas fezes (GREGORY et al., 2000), principalmente por serem bovinos terminados com dieta composta por 70% de concentrado e 30% de volumoso, que resulta em menor concentração de AGV no intestino grosso em relação à dieta composta por pastagem (CALLAWAY et al., 2013a). Todavia, enquanto foi observado constante concentração de *E. coli*, a concentração de bactérias aeróbias mesófilas decresceu ao longo do tempo de jejum, o que poderia indicar um favorecimento do ambiente intestinal para a manutenção de *E. coli* genérica.

Esta discordância também pode estar relacionada com possíveis componentes inibitórios presentes na dieta fornecida aos animais (CALLAWAY et al., 2013a). Visto que, pouco se sabe sobre a interferência de alguns resíduos agrícolas utilizados na nutrição de bovinos, como caroço e polpa de algodão, assim como casca e farelo de soja, sobre a ecologia da *E. coli* no TGI e que são amplamente utilizados na pecuária intensiva brasileira (GERON et al., 2014).

6.2 EXCREÇÃO DE STEC E EPEC

Conforme explanado por Callaway et al. (2013a) e Nastasijevic et al. (2014), devido a sua importância econômica e em saúde pública, existe um vasto conhecimento a respeito da ecologia da *E. coli* O157:H7 no trato gastrointestinal dos bovinos e da epidemiologia no ambiente. Entretanto, neste sentido, pouco se sabe sobre os demais

sorogrupos de STEC e EPEC (MONAGHAN et al., 2011; MOXLEY; SMITH, 2010; POLIFRONI et al., 2012).

Portanto, muitos dos resultados apresentados neste estudo para STEC (stx_1 e stx_2) e EPEC são inéditos e para a discussão dos mesmos foi utilizado o conhecimento existente para *E. coli* O157:H7.

A extensão do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas aumentou a concentração de STEC, tanto para stx_1 (Figura 07) como stx_2 (Figura 08) nas fezes dos bovinos. Entretanto, não foram detectadas diferenças na concentração de EPEC (Tabela 04). Estes resultados de STEC corroboram com os existentes para *E. coli* O157:H7 (BUCHKO et al., 2000; CALLAWAY et al., 2013a; POINTON et al., 2012), demonstrando que o jejum alimentar também favorece a concentração de STEC nas fezes.

Além disso, o fato preocupante dos bovinos positivos terem apresentado pelo menos 3,6 log de STEC (stx_1 e stx_2) por grama de fezes, com alguns animais, inclusive, excretando mais de 6 log/g, remete a necessidade de estudos adicionais para a caracterização e a mitigação desta população de STEC perante a sua importância econômica e em saúde pública, principalmente em relação ao gene stx_2 , que está incriminado a maioria dos surtos severos com a necessidade de hospitalização (ARTHUR et al., 2010; MUNNS et al., 2015; USDA-FSIS, 2012a, 2012b).

Estudos têm indicado um efeito paradoxal do jejum pré-abate, visto que, essa maior excreção fecal de *E. coli* O157:H7 pode estar associada tanto à redução de AOV no TGI, como à imunossupressão induzida por estresse que ocorre durante o período pré-abate (CROSSLAND et al., 2015). Além de desconhecido para STEC, este segundo efeito pode ser especialmente importante na pecuária brasileira, dado que mais de 80% do rebanho bovino brasileiro é composto por animais *Bos indicus*, principalmente da raça Nelore (FERRAZ; FELICIO, 2010), e que são caracterizados pela maior reatividade e susceptibilidade ao estresse em relação aos animais *Bos tauros* (SILVEIRA et al., 2008).

Nesta pesquisa, embora descritivamente evidente, não foi detectado aumento, ao nível de 5% de significância, nas ocorrências de STEC (stx_1 e stx_2) e EPEC nas fezes dos bovinos (Tabela 03). Entretanto, estes resultados sinalizam um possível aumento de bovinos colonizados e excretando STEC e EPEC devido a extensão do jejum alimentar entre 6 e 24 horas. O que corrobora com Kudva et al. (1995) para *E. coli* O157:H7 e

reforça a necessidade de estudos adicionais para a caracterização e mitigação destes patógenos.

Esses aumentos na ocorrência e na concentração de STEC são preocupantes, principalmente no que se refere ao fator de virulência *stx*₂, que está relacionado ao aumento da patogenicidade e frequentemente associado à casos severos e mortes em humanos, particularmente devido a SHU, que acomete, principalmente, crianças, idosos e imunocomprometidos (HE et al., 2012; KARMALI et al., 2010).

6.3 CONTAMINAÇÃO DA PELE DOS BOVINOS

No presente estudo, o tempo de jejum pré-abate dos bovinos avaliados caracterizou-se, em média, por 2 horas para manejo, embarque, transporte por 24 km e desembarque e, no restante do tempo, os animais permaneceram nos currais de abate sob dieta hídrica. Ou seja, a principal diferença entre os tratamentos deste estudo foram os diferentes tempos de permanência dos bovinos nos currais de abate.

A extensão do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas não aumentou a concentração de aeróbios mesófilos, *E. coli* genérica e coliformes totais na região do peito da pele dos bovinos (Tabela 05). Estes resultados estão em desacordo com o conhecimento vigente (BUNCIC et al., 2014; CALLAWAY et al., 2013a; POINTON et al., 2012), visto que, a contaminação da pele dos bovinos aumenta em função do tempo em locais com alta densidade animal, como o curral de abate (CALLAWAY et al., 2013a; USDA-FSIS, 2014a). Além disso, esta será agravada quando não ocorre o jejum alimentar prévio na propriedade rural, devido a maior quantidade de fezes que serão excretadas neste ambiente com alta densidade (GREGORY et al., 2000; POINTON et al., 2012).

Ademais, crescente concentração microbiana fecal também tem sido associada à crescente contaminação da pele dos bovinos (ARTHUR et al., 2010; POINTON et al., 2012), entretanto, no presente estudo também não foi detectado aumento na concentração fecal desses indicadores em função do tempo de jejum pré-abate (Figura 05 e 06).

Durante o processamento estatístico dos dados, observou-se que o efeito do “dia de abate” foi sempre mais expressivo (frequente $P < 0,0001$) do que o próprio efeito de tratamento, entretanto, não houve interação significativa ($P > 0,05$) entre estes efeitos.

Essa elevada variabilidade, considerada aleatória, pode ter sido a responsável por ocultar as diferenças esperadas entre os tratamentos para esses indicadores.

Por outro lado, a extensão do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas aumentou em até 5 vezes o risco de contaminação da pele dos bovinos na região do peito por STEC (*stx*₁; Figura 09 e Tabela 06) e em até 8 vezes por EPEC (Figura 10 e Tabela 06). Além disso, também aumentou gradativamente a concentração de STEC (*stx*₁; Figura 12) e de EPEC nesta região ao longo do jejum pré-abate (Figura 11).

Estes resultados corroboram com os existentes para *E. coli* O157:H7 (CALLAWAY et al., 2013a; DUFFY et al., 2014; NASTASIJEVIC et al., 2014; POINTON et al., 2012), demonstrando que o jejum alimentar de bovinos e a permanência no curral de abate gradativamente aumentam as ocorrências e as concentrações de STEC e EPEC na pele dos bovinos.

Três aspectos importantes podem ser os responsáveis por estes resultados: primeiro, a ausência de jejum pré-embarque (GREGORY et al., 2000; POINTON et al., 2012), segundo, a crescente concentração de STEC nas fezes (ARTHUR et al., 2010; POINTON et al., 2012), conforme verificado por este estudo (Figura 07 e 08), e terceiro, a permanência dos bovinos em locais com alta densidade animal, como os currais de abate (DEWELL et al., 2008a; FRIESEMA et al., 2011; POINTON et al., 2012; VIDOVIC; KORBER, 2006).

Nesta pesquisa, embora descritivamente perceptível, não foi detectado aumento, ao nível de 5% de significância, na ocorrência (Figura 09) e na concentração (Tabela 07) de STEC (*stx*₂) na região do peito da pele dos bovinos em função da extensão do jejum alimentar entre 6 e 24 horas. Entretanto, torna-se necessário destacar esta observação devido a importância do fator de virulência *stx*₂ da STEC em saúde pública (HE et al., 2012; KARMAI et al., 2010).

6.4 CONDIÇÃO HIGIÊNICA E SANITÁRIA DAS CARCAÇAS

Embora descritivamente evidente, a redução do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas não aumentou, ao nível de 5% de significância, as ocorrências de rupturas do TGI por falhas sanitárias operacionais e de desvios de carcaça para o DIF devido a contaminações por conteúdo do TGI (Tabela 08).

Estes resultados sugerem que ainda existe a necessidade de submeter os bovinos a um certo tempo de jejum alimentar pré-abate com o objetivo de reduzir o volume do

TGI e facilitar o processo de evisceração (PARDI et al., 2005; POINTON et al., 2012; WARRISS, 2010), mesmo com a evolução tecnológica dos equipamentos e das operações sanitárias durante o processo de abate para minimizar a ocorrência de rupturas e de extravasamentos do conteúdo do TGI, que resultam na contaminação pontual de carcaças (BUNCIC et al., 2014; MILIOS et al., 2014; POINTON et al., 2012; SERRAINO et al., 2012). Assim sendo, tem-se recomendado que este breve período de jejum alimentar pré-abate dos bovinos seja realizado na propriedade rural (pré-embarque), preferencialmente em um ambiente com baixa densidade animal (CALLAWAY et al., 2013a; GREGORY et al., 2000; POINTON et al., 2012).

Por outro lado, no presente estudo, a extensão do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas resultou no aumento gradual de aeróbios mesófilos na superfície das carcaças (Figura 13). Além disso, o risco de contaminação das carcaças por *E. coli* genérica e coliformes totais aumentam em até 5 e 2 vezes, respectivamente, com a extensão do jejum pré-abate entre 6 e 24 horas (Figura 14 e Tabela 09). As concentrações de *E. coli* genérica (Figura 15) e coliformes totais (Figura 16) na superfície das carcaças também aumentaram gradativamente ao longo do jejum pré-abate.

Para o atual sistema de abate, existe um consenso técnico-científico de que as fezes são a principal origem da contaminação da pele, e a pele é a predominante fonte de contaminação da carcaça bovina, que ocorre principalmente durante o processo de esfolagem (ARTHUR et al., 2007; BUNCIC et al., 2014; HAUGE et al., 2012; SERRAINO et al., 2012). Em particular, a região do peito dos bovinos, que é considerada o local mais contaminado, tanto na pele como na carcaça obtida (GILL, 2004; HAUGE et al., 2012; ISO, 2003; MCEVOY et al., 2000).

Em vista disso, o gradativo aumento da contaminação das carcaças por aeróbios mesófilos, *E. coli* genérica e coliformes totais com a extensão do tempo de jejum pré-abate, conforme verificado por este estudo (Figuras 13, 14, 15 e 16 e Tabelas 09), deveria ter sido precedido de gradativo aumento da concentração microbiana fecal (GREGORY et al., 2000; CALLAWAY et al., 2013a) e também de gradativo aumento da contaminação da pele (ARTHUR et al., 2010; POINTON et al., 2012). Entretanto, ambos aspectos não foram observados neste estudo para esses indicadores higiênico-sanitários.

Provavelmente, esse gradual aumento observado na contaminação das carcaças não está relacionado propriamente com o jejum alimentar, dado que, não foi observado aumento na concentração fecal desses indicadores higiênico-sanitários ao longo do tempo de jejum alimentar (Figuras 05 e 06), conforme também apontado por Pointon et al. (2012) e Jordan e McEwen (1998). Dessa forma, este gradual aumento na contaminação das carcaças por estes indicadores possivelmente esteja mais relacionado com a contínua permanência dos bovinos em um ambiente com alta densidade, como o curral de abate, e que foi agravado pela ausência de jejum pré-embarque na propriedade rural (GREGORY et al., 2000; POINTON et al., 2012).

Neste estudo, a análise das carcaças considerou as regiões do coxão, flanko, peito e pescoço (ISO, 2003), entretanto, a análise das peles considerou somente a região do peito. Portanto, possivelmente outras regiões da pele dos bovinos, como coxão, flanko e/ou pescoço, divergiram entre os tratamentos para esses indicadores higiênico-sanitários, o que justificaria os resultados observados nas carcaças.

Do ponto de vista higiênico-sanitário e de controle de produção, a possibilidade de reduzir a ocorrência e/ou a contagem de indicadores higiênico-sanitários, como bactérias aeróbias mesófilas e *E. coli* genérica, em testes bacterianos de rotina realizados em carcaças (COMISSÃO EUROPEIA, 2007; USDA-FSIS, 1996), representa a desejável redução de falhas higiênico-sanitárias no controle de produção, principalmente em indústrias que utilizam o plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC (MILIOS et al., 2014).

Embora exista um consenso técnico-científico entre a extensão do tempo de jejum pré-abate, que contempla o tempo de transporte e de curral de abate, e o aumento de *E. coli* O157:H7 em carcaças bovinas (CALLAWAY et al., 2013a; DUFFY et al., 2014; NASTASIJEVIC et al., 2014; POINTON et al., 2012), nenhuma das carcaças avaliadas no presente estudo apresentaram ocorrência de STEC (*stx*₁ ou *stx*₂) e/ou de EPEC.

Diferente dos indicadores higiênico-sanitários avaliados, houve gradativo aumento na concentração fecal de STEC (*stx*₁ ou *stx*₂) (Figuras 07 e 08), além de gradativo aumento na contaminação da pele da região do peito por STEC (*stx*₁) e EPEC (Figuras 09, 10, 11 e 12, e Tabela 06) com a extensão do tempo de jejum pré-abate, o que também deveria ter resultado em gradativo aumento de STEC nas carcaças bovinas.

Uma possível explicação para este resultado inesperado foi a sensibilidade das análises moleculares, considerada uma das limitações do presente estudo. Devido ao objetivo quantitativo, não foi realizado o recomendado enriquecimento prévio das amostras em meio de cultivo seletivo (USDA-FSIS, 2015, 2014b, 2014c). Além disso, uma pequena alíquota das amostragens por esponja foi utilizada, 1,4 ml, que corresponde a 22,4 cm² de área amostrada. Ademais, também foi observado que a maioria dos resultados positivos situaram-se próximos ao limite de detecção analítico da qPCR, o que indica a possibilidade de muitos resultados falso negativos.

6.5 IMPLICAÇÕES

Em princípio, muitas das características do sistema produtivo brasileiro, como a ausência de jejum alimentar na propriedade rural e o excessivo tempo de transporte e de curral de abate, que resultam em excessivo tempo de jejum alimentar total, vão em desconformidade aos extenuantes esforços adotados por muitos países para o controle e redução de patógenos, como STEC, da cadeia produtiva bovina (BUNCIC et al., 2014; CALLAWAY et al., 2013a; POINTON et al., 2012).

Portanto, existe a iminente necessidade de estudos que elucidem a ecologia, a epidemiologia e o real impacto em saúde pública de STEC no Brasil. Para que, desta forma, possam ser elaboradas Boas Práticas Agropecuárias para o controle e mitigação deste patógeno da carne bovina, cabíveis de aplicação nos diversos cenários produtivos da pecuária brasileira.

Nas condições estabelecidas por este estudo, a redução do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas de bovinos *Bos indicus* (Nelore), terminados em confinamento, pode representar para as indústrias a redução de custos operacionais com o setor dos currais, tais como, água, energia, funcionários, manutenções, assim como, a redução de custos com a infraestrutura dos currais de abate, como o tamanho e a quantidade dos mesmos, devido ao menor tempo de permanência dos bovinos no estabelecimento, ou seja, devido ao maior giro produtivo.

Também pode representar menos condenações e desvios higiênico-sanitários no controle de produção, maior rendimento produtivo e incremento na validade comercial, devido a melhor condição higiênico-sanitária durante o processo de abate dos bovinos.

A possibilidade de reduzir STEC na carne bovina, além de ser um fomento à saúde pública, constitui-se em um estímulo à economia brasileira devido a redução de barreiras comerciais e a menor devolução de mercadorias.

Entretanto, nas condições estabelecidas por este estudo, não se recomenda a aplicação de jejum pré-abate total inferior a 6 horas sem a realização de estudos adicionais, devido a possibilidade de aumento na ocorrência de rupturas do TGI durante o processo de evisceração.

7 CONCLUSÕES

Nas condições estabelecidas por este estudo, a redução do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas de bovinos *Bos indicus* (Nelore), terminados em confinamento, melhora a condição higiênico-sanitária durante o processo de abate, tanto para bactérias indicadoras da condição higiênica e sanitária, como para os patógenos STEC e EPEC. Uma vez que reduz a excreção de STEC e EPEC pelos bovinos, minimiza a contaminação da pele por STEC e resulta em melhor condição higiênico-sanitária das carcaças.

REFERÊNCIAS

- AFSCA. **Comite scientifique de l'agence federale pour la securite de la chaine alimentaire**. AVIS 39-2006 - Critères d'hygiène des procédés en ce qui concerne le nombre de colonies aérobies, les Enterobacteriaceae et Salmonella. Disponível em: <http://www.afsca.be/home/com-sci/doc/avis06/AVIS39-006_Fr_DOSSIER2006-11.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2014.
- APPLEYARD, R. K. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. **Genetics**, v.39, n.4, p.440, 1954.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 19 ed. Official Method 990.12. Gaithersburg:AOAC INTERNATIONAL, 2012a.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 19 ed. Official Method 998.08. Gaithersburg:AOAC INTERNATIONAL, 2012b.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 19 ed. Official Method 991.14. Gaithersburg:AOAC INTERNATIONAL, 2012c.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 19 ed. Official Method 934.01. Gaithersburg:AOAC INTERNATIONAL, 2012d.
- AQIS. Australian Quarantine and Inspection Service. **AQIS Notice Meat 2003/06**. Revised ESAM program.
- AQIS. Australian Quarantine and Inspection Service. **AQIS Notice Meat 2007/12**. ESAM (*E. coli* – *Salmonella*) TVC sampling of carcasses in EU listed establishments.
- ARTHUR, T.M.; AHMED, R.; CHASE-TOPPING, M.; KALCHAYAN, N.; SCHMIDT, J.W.; BONO, J.L. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from super-shedding cattle. **Applied Environmental Microbiology**, v.79, n.14, p.4294-4303, 2013.
- ARTHUR, T.M.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; BOLISEVAC, J.M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, L.; KOOHMARAIE, M. Super shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle and the impact on beef carcass contamination. **Meat Science**, v.86, p.32-37, 2010.
- ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; BRICHTA-HARHAY D.M.; GUERINI, M.N.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.D. Transportation and lairage environment effects on prevalence, numbers, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on hides and carcasses of beef cattle at processing. **Journal of Food Protection**, v.70, n.2, p.280-286, 2007.
- BASTIEN, D.; LUCBERT, J.; CARTIER, P. La propriété des bovins à l'abattoir: état des lieux de la situation, facteurs explicatifs et outil de notation. **Rencent Recherches Ruminants**, v.13, p.317-320, 2006.

BAKER, C.A.; RUBINELLI, P.M.; PARK, S.H.; CARBONERO, F.; RICKE, S.C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. **Food Control**, v.59, p.407-419, 2016.

BELLIN, T.; PULZ, M.; MATUSSEK, A.; HEMPEN, H.G.; GUNZER, F. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. **Journal of clinical microbiology**, v.39, n.1, p.370-374, 2001.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal:Funep, 2011. 616p.

BERCHIELLI, T.T.; SADER, A.D.O.; TONANI, F.L.; PAZIANI, S.D.F.; ANDRADE, P.D. Avaliação da determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido pelo sistema ANKOM. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1572-1578, 2001.

BERGHOLZ, T. M.; WHITTAM, T.S. Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.352-362, 2007.

BOLTON, D. J. Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, p.357-365, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Norma Interna DIPOA/SDA nº 1, de 17 de junho de 2015. Aprovar os procedimentos para a coleta e análise de *Escherichia coli* verotoxigênica e *Salmonella* spp. em carne de bovino *in natura* utilizada na formulação de produtos cárneos, cominutados, prontos para serem cozidos, fritos ou assados. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 2003

BRASIL. Decreto nº. 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial [da] União**, Rio de Janeiro, RJ, v.155, p.10.785, 7 jul. 1952. Seção 1.

BUCHKO, S. J.; HOLLEY, R. A.; OLSON, W. O.; GANNON, V. P. J.; VIEIRA, D. M. The effect of fasting and diet on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.80, p.741-744, 2000.

BUNCIC, S.; NYCHAS, G.; LEE, M.R.F.; KOUTSOUMANIS, K.; HÉBRAUD, M.; DESVAUX, M.; CHORIANOPOULOS, N.; BOLTON, D.; BLAGOJEVIC, B.; ANTIC, D. Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances. **Meat Science**, v.97, p.288-297, 2014.

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; LONERAGAN, G. H.; CARR, M. A.; NISBET, D. J. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) ecology in cattle and management based options for reducing fecal shedding. Agriculture. **Food and Analytical Bacteriology Journal**, v.3, p.39-69, 2013a.

CALLAWAY, T.R.; ANDERSON, R.C.; EDRINGTON, T.S.; GENOVESE, K.J.; HARVEY, R.B.; POOLE, T.L.; NISBET, D.J. Novel methods for pathogen control in livestock pre-harvest: an update. **Advances in Microbial Food Safety**, p.275-304, 2013b.

CALLAWAY, T.R.; CARR, M.A.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; NISBET, D.J. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: A review after 10 years. **Current Issues in Molecular Biology**, v.11, p.67-80, 2009.

CDC-HHS. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). U.S. Department of Health & Human Services (HHS). **E.coli Homepage. General Information**. Page last updated: November 6, 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

CHASE-TOPPING, M.; GALLY, D.; LOW, C.; MATTHEWS, L.; WOOLHOUSE, M. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p.904-912, 2008.

CHO, S.; FOSSLER, C. P.; DIEZ-GONZALEZ, F.; WELLS, S. J.; HEDBERG, C. W.; KANEENE, J. B.; RUEGG, P. L.; WARNICK, L. D.; BENDER, J. B. Herd-level risk factors associated with fecal shedding of Shiga toxin-encoding bacteria on dairy farms in Minnesota, USA. **Canadian Veterinary Journal**, v.54, p.693-697, 2013.

CLEARY, J.; LAI, L.C.; SHAW, R.K.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M.S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v.150, n.3, p.527-538, 2004.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 1099/2009 do Conselho de 24 de set. de 2009. Relativo à proteção dos animais no momento da occisão. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, p.L303/01-L303/30, 18 nov. 2009.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 1441/2007 do Conselho de 05 de dez. de 2007. Altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, p.L322/12-L322/29, 05 dez. 2007.

COSSI, M.V.C.; BURIN, R.C.K.; CAMARGO, A.C.; DIAS, M.R.; LANNA, F.G.P.A.; PINTO, P.S.D.A.; NERO, L.A. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. **Food Control**, v.40, p.320-323, 2014.

COSTA, M. J. P.; HUERTAS, S. M.; GALLO, C.; DALLA COSTA, O. A. Strategies to promote farm animal welfare in Latin America and their effects on carcass and meat quality traits. **Meat science**, v.92, n.3, p.221-226, 2012.

CRIM, S.; IWAMOTO, M.; HUANG, J.; GRIFFIN, P.; GILLISS, D.; CRONQUIST, A.; CARTTER, M.; TOBIN-D'ANGELO, M.; BLYTHE, D.; SMITH, K.; LATHROP, S.; ZANSKY, S.; CIESLAK, P.; DUNN, J.; HOLT, K.; LANCE, S.; TAUXE, R.; HENAO, O. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food- Foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 2006-2013. **Centers for Disease Control and Prevention MMWR**, v.63, n.15, p.328-332, 2014.

CROSSLAND, W.L.; CALLAWAY, T.R.; TEDESCHI, L.O. Shiga toxin-producing *E. coli* and ruminant diets: A match made in heaven? In: **Food Safety: Emerging Issues, Technologies and Systems**, p.185-214, 2015.

CRUZ, T.F.; ARAUJO, J.P. Cultivation of PCV2 in swine testicle cells using the shell vial technique and monitoring of viral replication by qPCR and RT-qPCR. **Journal of virological methods**, v.196, p.82-85, 2014.

DALLAL, M.M.S.; DOYLE, M.P.; REZADEHBASHI, M.; DABIRI, H.; SANAEI, M.; MODARRESI, S.; SHARIFI-YAZDI, M.K. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. **Food Control**, v.21, n.4, p.388-392, 2010.

DEWELL, G.A.; SIMPSON, C.A.; DEWWEL, R.D.; HYATT, D.R.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; MORLEY, P.S.; GRANDIN, T.; SMITH, G.C.; DARGATZ, D.A.; WAGNER, B.A.; SALMAN, M.D. Impact of transportation and lairage on hide contamination with *Escherichia coli* O157 in finished beef cattle. **Journal of Food Protection**, v.71, n.6, p.1114-1118, 2008a.

DEWELL, G.A.; SIMPSON, C.A.; DEWELL, R.D.; HYATT, D.R.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; MORLEY, P.S.; GRANDIN, T.; SMITH, G.C.; DARGATZ, D.A.; WAGNER, B.A.; SALMAN, M.D. Risk associated with transportation and lairage on hide contamination with *Salmonella enterica* in finished beef cattle at slaughter. **Journal of Food Protection**, v.71, n.11, p.2228-2232, 2008b.

DONG, P.; ZHU, L.; MAO, Y.; LIANG, R.; NIU, L.; ZHANG, Y.; LUO, X. Prevalence and profile of *Salmonella* from samples along the production line in Chinese beef processing plants. **Food Control**, v.38, p.54-60, 2014.

DUFFY, G.; BURGESS, C.M.; BOLTON, D.J. A review of factors that effect transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain. **Meat Science**, v.97, p.375-383, 2014.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **EFSA Journal** 2013, v.11, n.4, 2013a. 250p.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (bovine animals). **EFSA Journal** **2013**, v.11, n.6, 2013b. 261p.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. **EFSA Journal** **2013**, v.11, n.4, 2013c. 106p.

EFSA. Scientific/technical report submitted to EFSA estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human Salmonella infections in the European Union. Submitted by **DTU Food in response to Question No. EFSA-Q-2010-00685**. Accepted for Publication on 28 July 2011. Disponível em: < <http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/doc/184e.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2014.

ENGLAND, E. M.; SCHEFFLER, T. L.; KASTEN, S. C.; MATARNEH, S. K.; GERRARD, D. E. Exploring the unknowns involved in the transformation of muscle to meat. **Meat science**, v.95, n.4, p.837-843, 2013.

FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; DE REU, K.; GOVARIS, A.; HEGGUM, K.; HEYNDRIKX, M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY, D.; MISZCZYCHA, S.; MOUSSIEGT, S.; VERSTRAETE, K.; CERF, O. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, p.190-212, 2013.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; JINNEMAN, K. Chapter 4A - Diarrheagenic *Escherichia coli*, Updated June 2016. **FDA Bacteriological Analytical Manual Online (BAM)**. Disponível em: < <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>>. Acesso em: 27 out. 2016.

FERENS, W. A.; HOVDE, C.J. *Escherichia coli* O157:H7: Animal reservoir and sources of human infection. **Foodborne Pathogens Disease**, v.8, p.465-487, 2011.

FERGUSON, D. M.; WARNER, R. D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**, v.80, n.1, p.12-19, 2008.

FERRAZ, J.B.S.; FELÍCIO, P.E. Production systems—An example from Brazil. **Meat science**, v.84, n.2, p.238-243, 2010.

FREMAUX, B.; DELIGNETTE-MULLER, M. L.; PRIGENTCOMBARET, C.; GLEIZAL, A.; VERNZOY-ROZAND, C. Growth and survival of non-O157:H7 Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.89-99, 2007.

FRANK, C.; WERBER, D.; CRAMER, J.P.; ASKAR, M.; FABER, M.; HEIDEN, M.; BERNARD, H.; FRUTH, A.; PRAGER, R.; SPODE, A.; WADL, M.; ZOUFALY, A.; JORDAN, S.; KEMPER, M.J.; FOLLIN, P.; MULLER, L.; KING, L.A.; ROSNER, B.; BUCHHOLZ, U.; STARK, K.; KRAUSE, G. Epidemic profile of Shiga-toxin—

producing *Escherichia coli* O104: H4 outbreak in Germany. **New England Journal of Medicine**, v.365, n.19, p.1771-1780, 2011.

FREE, A. L.; DUOSS, H.A.; CALLAWAY, T.R.; CARROLL, J.A.; SCHMIDT, T.B.; DONALDSON, J.R. Survival of O157:H7 and non-O157 serotypes of *Escherichia coli* in bovine bile salts and rumen fluid. **Foodborne Pathogens Disease**, v.9, p.1010-1014, 2012.

FRIESEMA, I. H. M.; VAN DE KASSTEELE, J.; DE JAGER, C.M.; HEUVELINK, A.E.; VAN PELT, D.W. Geographical association between livestock density and human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infections. **Epidemiology & Infection**, v.139, p.1081-1087, 2011.

FSA. Food Standards Agency. **FSA/0951/1104 - Clean Beef Cattle for slaughter. A guide for producers**. Oct. 2007. Disponível em: < [http://multimedia.food.gov.uk/multimedia/pdfs/publication/cleanbeefsaf1007 .pdf](http://multimedia.food.gov.uk/multimedia/pdfs/publication/cleanbeefsaf1007.pdf)>. Acesso em: 03 jun. 2014.

FULLER, C.A.; PELLINO, C.A.; FLAGLER, M.J.; STRASSER, J.E.; WEISS, A.A. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. **Infection and immunity**, v.79, n.3, p.1329-1337, 2011.

GERON, L. J. .; MOURA, D. C.; RODRIGUES, D. N.; PAULA, E. J. H.; TRAUTMANN-MACHADO, R. J.; GARCIA, J.; SILVA, D. A. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.4, p.2673-2684, 2014.

GILL, C.O. Visible contamination on animals and carcasses and the microbiological condition of meat. **Journal of Food Protection**, v.67, n.2, p.413-419, 2004.

GIRON, J.A.; HO, A.S.; SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v.254, p.710-713, 1991.

GOMES, T.A.; ELIAS, W.P.; SCALETISKY, I.C.; GUTH, B. E.; RODRIGUES, J.F.; PIAZZA, R.M.; FERREIRA, L.C.S.; MARTINEZ, M.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v.47, p.3-30, 2016.

GOOSNEY, D. L.; DE GRADO, M.; FINLAY, B. B. Putting E. coli on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton. **Trends in Cell Biology**, v.9,p.11-14, 1999.

GOULD, L. H.; MODY, R. K.; ONG, K. L.; CLOGHER, P.; CRONQUIST, A. B.; GARMAN, K. N.; LATHROP, S.; MEDUS, C.; SPINA, N. L.; WEBB, T. H.; WHITE, P. L.; WYMORE, K.; GIERKE, R. E.; MAHON, B. E.; GRIFFIN, P. M. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with E. coli O157 infections. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, p.453-460, 2013.

GRAUKE, L.J.; KUDVA, I.T.; YOON, J.W.; HUNT, C.W.; WILLIAMS, C.J.; HOVDE, C.J. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2269-2277, 2002.

GRAHAM, J. P.; NACHMAN, K.E. Managing waste from confined animal feeding operations in the United States: The need for sanitary reform. **Journal of Water and Health**, v.8, p.646-67, 2010.

GREGORY, N.G.; JACOBSON, L.H.; NAGLE, T.A.; MUIRHEAD, R.W.; LEROUX, G.J. Effect of preslaughter feeding system on weight loss, gut bacteria, and the physicochemical properties of digesta in cattle. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.43, p.351-361, 2000.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: Eds C. L. GYLES, J. F.; PRESCOTT, J. G.; SINGER, C. O. THOEN. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Blackwell Publishing, p.267-308, 2010.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing: An overview. **Journal of Animal Science**, v.85, n.13, p.E45-E62, 2007.

HARDEGEN, C.; MESSLER, S.; HENRICH, B.; PFEFFER, K.; WÜRTHNER, J.; MACKENZIE, C.R. A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v.9, n.1, p.1, 2010.

HAUGE, S.J.; NAFSTAD, O.; ROTTERRUD, O.; NESBAKKEN, T. The hygienic impact of categorization of cattle by hide cleanliness in the abattoir. **Food Control**, v.27, 2012.

HE, X.; QUIÑONES, B.; MCMAHON, S.; MANDRELL, R. E. A single-step purification and molecular characterization of functional Shiga toxin 2 variants from pathogenic *Escherichia coli*. **Toxins**, v.4, n.7, p.487-504, 2012.

HERBERT, L.; VALI, L.; HOYLE, D.; INNOCENT, G.; MCKENDRICK, I.; PEARCE, M.; MELLOR, D.; PORPHYRE, T.; LOCKING, M.; ALLISON, L.; HANSON, M.; MATTHEWS, L.; GUNN, G.; WOOLHOUSE, M.; CHASE-TOPPING, M. *E. coli* O157 on Scottish cattle farms: Evidence of local spread and persistence using repeat cross-sectional data. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.95, 2014.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **(ISO) 17604:2003(E)**. Microbiology of food and animal feeding stuffs – carcass sampling for microbiological analysis. Switzerland, 2003. 14 p.

JACOB, M. E.; NAGARAJA, T. G. Use of direct-fed microbials as a preharvest food safety intervention in cattle. In: **Direct-Fed Microbials and Prebiotics for Animals**. Springer New York, p.189-202, 2012.

JACOBSON, L.H.; NAGLE, T.A.; GREGORY, N.G.; BELL, R.G.; LE ROUX, G.; HAINES, J.M. Effect of feeding pasture-finished cattle different conserved forages on *Escherichia coli* in the rumen and faeces. **Meat Science**, v.62, p.93-106, 2002.

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.

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

KARMALI, M.A.; GANNON, V.; SARGEANT, J.M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary microbiology**, v.140, n.3, p.360-370, 2010.

KUDVA, I. T.; HATFIELD, P.G.; HOVDE, C.J. Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a sheep model. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.363-1370, 1995.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T.; STORGAARD, T.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.; BOTNER, A. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Veterinary microbiology**, v.89, n.2, p.97-114, 2002.

MATHUSA, EMILY C.; CHEN, Y.; ENACHE, E.; HONTZ, L. Non-O157 Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Foods. **Journal of Food Protection**, v.73, n.9, p.1721-1736, 2010.

MCEVOY, J.M.; DOHERTY, A.M.; FINNERTY, M.; SHERIDAN, J.J.; MCGUIRE, L.; BLAIR, I.S.; MCDOWELL, D.A.; HARRINGTON, D. The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, n.5, p.390-395, 2000.

MENRATH, A.; WIELER, L.H.; HEIDEMANN, K.; SEMMLER, T.; FRUTH, A.; KEMPER, N. Shiga toxin producing *Escherichia coli*: identification of non-O157:H7-Super-Shedding cows and related risk factors. **Gut Pathogens**, v.2, n.7, p.1-9, 2010.

MILIOS, K.T.; DROSINOS, E.H.; ZOIPOPOULOS, P.E. Food Safety Management System validation and verification in meat industry: Carcass sampling methods for microbiological hygiene criteria – A review. **Food Control**, v.43, p.74-81, 2014.

MIRANDA-DE-LA-LAMA, G.C.; PASCUAL-ALONSO, M.; GUERRERO, A.; ALBERTI, P.; ALIERTA, S.; SANS, P.; GAJAN, J.P.; VILLARROEL, M.; DALMAU, A.; VELARDE, A.; CAMPO, M.M.; GALINDO, F.; SANTOLARIA, M.P.; SAÑUDO, C.; MARÍA, G. A. Influence of social dominance on production, welfare and the quality of meat from beef bulls. **Meat science**, v.94, n.4, p.432-437, 2013.

MONAGHAN, A. I.; BYRNE, B.; FANNING, S.; SWEENEY, T.; MCDOWELL, D. BOLTON, D. J. Serotypes and virulence profiles of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.8662-8668, 2011.

MOXLEY, R.A.; SMITH, D.R. Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, n.1, p.29-56, 2010.

MUNNS, K. D.; SELINGER, L. B.; STANFORD, K.; GUAN, L.; CALLAWAY, T. R.; MCALLISTER, T. A. Perspectives on super-shedding of *Escherichia coli* O157: H7 by cattle. **Foodborne pathogens and disease**, v.12, n.2, p.89-103, 2015.

NASTASIJEVIĆ, I.; MITROVIĆ, R.; JANKOVIĆ, V. STEC in the beef chain: One health approach. **Tehnologija mesa**, v.55, n.2, p.93-116, 2014.

NAYLOR, S. W.; ROE, A. J.; NART, P.; SPEARS, K.; SMITH, D. G.; LOW, J. C.; GALLY, D. L. *Escherichia coli* O157 : H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the LEE4 operon. **Microbiology**, v.151, p.2773- 2781, 2005.

NAYLOR, S.W.; LOW, J.C.; BESSER, T.E.; MAHAJAN, A.; GUNN, G.J.; PEARCE, M.C.; MCKENDRICK, I.J.; SMITH, D.G.E.; GALLY, D.L. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. **Infection and Immunity**, v.71, n.3, p.1505-1512, 2003.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2.ed. v.1, Goiânia: Editora da UFG, 2005. 624p.

PATON, A.W.; PATON, J.C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays forstx 1, stx 2, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb O111, and rfb O157. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.2, p.598-602, 1998.

PAULA, C.M.D.; CASARIN, L.S.; TONDO, E. C. *Escherichia coli* O157: H7 - patógeno alimentar emergente. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v.2, n.4, p.23-33, 2014.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G.F.; EVANS, P.S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H.A.; POÂ SFAI, G.R.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTEBECK, E.J.; DAVIS, N.W.; LIMK, A.; DIMALANTAK, E.T.; POTAMOUSIS, K.D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T.A.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D.C.; WELCHI, R.A.; PÓSFAL, G. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v.409, n.6819, p. 529-533, 2001.

PERNA, N. T.; MAYHEW, G. F.; POSFAI, G.; ELLIOTT, S.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B.; BLATTNER, F. R. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v.66, p.3810-3817, 1998.

PERSSON, S.; OLSEN, K. E. P.; ETHELBERG, S.; SCHEUTZ, F. Subtyping Method for Escherichia coli Shiga Toxin (Verocytotoxin) 2 Variants and Correlations to Clinical Manifestations. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.2020-2024, 2007.

PIGHIN, D. G.; DAVIES, P.; PAZOS, A. A.; CECONI, I.; CUNZOLO, S. A.; MENDEZ, D.; BUFFARINI, M.; GRIGIONI, G. Biochemical profiles and physicochemical parameters of beef from cattle raised under contrasting feeding systems and pre-slaughter management. **Animal Production Science**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1071/AN13378>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

POINTON, A.; KIERMEIER, A.; FEGAN, N. Review of the impact of pre-slaughter feed curfews of cattle, sheep and goats on food safety and carcass hygiene in Australia. **Food Control**, v.26, p.313-321, 2012.

POLIFRONI, R.; ETCHEVERRÍA, A. I.; SANZ, M. E.; CEPEDA, R. E.; KRÜGER, A.; LUCCHESI, P. M. A.; FERNÁNDEZ, D.; PARMA, A.E.; PADOLA, N.L. Molecular characterization of shiga toxin-producing Escherichia coli Isolated from the environment of a dairy farm. **Current Microbiology**, v.65, n.337, p.1-7, 2012.

PRUIMBOOM-BREES, I. M.; MORGAN, T.W.; ACKERMANN, M.R.; NYSTROM, E.D.; SAMUEL, J.E.; CORNICK, N.A.; MOON, H.W. Cattle lack vascular receptors for Escherichia coli O157:H7 shiga toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v.97, p.10325-10329, 2000.

RASMUSSEN, M. A.; WICKMAN, T.L.; CRAY, W.C.; CASEY, T.A. Escherichia coli O157:H7 and the rumen environment. In: Eds. STEWART, C.S.; FLINT, J.J. **E. coli O157 in Farm Animals**. New York: CABI Publishing, p.39-49, 1999.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare Escherichia coli Serotype. **The New England Journal of Medicine**, v.308, p.681-685, 1983.

ROMERO, M. H.; URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; SÁNCHEZ, J. A.; MIRANDA-DE LA LAMA, G. C. Risk factors influencing bruising and high muscle pH in Colombian cattle carcasses due to transport and pre-slaughter operations. **Meat science**, v.95, n.2, p.256-263, 2013.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.A.; ROY, S.L.; JONES, J.L.; GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.1, 2011.

SCHEUTZ, F. Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli. **Microbiology Spectrum**, v.2, n.3, p.1-15, 2014.

SCHEUTZ, F.; TEEL, L. D.; BEUTIN, L.; PIERARD, D.; BUVENS, G.; KARCH, H.; MELLMANN, A.; CAPRIOLI, A.; TOZZOLI, R.; MORABITO, S.; STROCKBINE, N. A.; MELTON-CELSA, A. R.; SANCHEZ, M.; PERSSON, S.; O'BRIEN, A. D.

Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p.2951-2963, 2012.

SEMENOV, A. M.; KUPRIANOV, A.A.; VAN BRUGGEN, A.H.C. Transfer of enteric pathogens to successive habitats as part of microbial cycles. **Microbial Ecology**, v.60, p.239-249, 2010.

SENG, P.M; LAPORTE, R. Animal welfare: the role and perspectives of the meat and livestock sector. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties - OIE**, v.24, n.2, p.613-623, 2005.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of bacteriology**, v.189, n.23, p.8746-8749, 2007.

SERRAINO, A.; BARDASI, L.; RIU, R.; PIZZAMIGLIO, V.; LIUZZO, G.; GALLETTI, G.; GIACOMETTI, F.; MERIALDI, G. Visual evaluation of cattle cleanliness and correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. **Meat Science**, v.90, p.502-506, 2012.

SHAW, D.J.; JENKINS, C.; PEARCE, M.C.; CHEASTY, T.; GUNN, G.J.; DOUGAN, G.; SMITH, H.R.; WOOLHOUSE, M.E.; FRANKEL, G. Shedding Patterns of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Strains in a Cohort of Calves and Their Dams on a Scottish Beef Farm. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.12, p.7456-7465, 2004.

SILVEIRA, I. D. B.; FISCHER, V.; FARINATTI, L. H. E.; RESTLE, J.; ALVES FILHO, D. C. **Revista brasileira de zootecnia**, v.37, n.10, p.1808-1814, 2008.

SMITH, D. R. Cattle Production Systems: Ecology of existing and emerging *Escherichia coli* types related to foodborne illness. **Annual Review of Animal Biosciences**, v.2, n.1, p.445-468, 2014.

SMITH, G. G.; GOEBEL, S. E.; CULBERT, C. R.; GUILBAULT, L. A. Reducing the public health risk of *Escherichia coli* O157 exposure by immunization of cattle. **Canadian Journal of Public Health**, v.104, n.1, p.e9-e11, 2013.

SOFOS, J.N.; KOICHEVAR, S.L.; REAGAN, J.O.; SMITH, G.C. Extent of beef carcass contamination with *Escherichia coli* and probabilities of passing US regulatory criteria. **Journal of Food Protection**, v.62, n.3, p.234-238, 1999.

SOUZA, C.D.O.; MELO, T.R.B.; MELO, C.D.S.B.; MENEZES, Ê.M.; CARVALHO, A.C.D.; MONTEIRO, L.C.R. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.7, n.2, p.79-91, 2016.

STACEY, K. F.; PARSONS, D.J.; CHRISTIANSEN, K.H.; BURTON, C.H. Assessing the effect of interventions on the risk of cattle and sheep carrying *Escherichia coli* O157:H7 to the abattoir using a stochastic model. **Preventive Veterinary Medicine**, v.79, p.32-45, 2007.

STEVENS, M. P.; VAN DIEMEN, P. M.; DZIVA, F.; JONES, P. W.; WALLIS, T. S. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. **Microbiology**, v.148, p.3767-3778, 2002.

TARR, P. I.; GORDON, C. A.; CHANDLER, W. L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **The Lancet**, n.365, p.1073-1086, 2005.

TEKE, B.; AKDAG, F.; EKIZ, B.; UGURLU, M. Effects of different lairage times after long distance transportation on carcass and meat quality characteristics of Hungarian Simmental bulls. **Meat science**, v.96, n.1, p.224-229, 2014.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.5, p.508-513, 2002.

TSENG, M.; FRATAMICO, P. M.; MANNING, S. D.; FUNK, J. A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine: the public health perspective. **Animal Health Research Reviews**, v.15, p.63-75, 2014.

USDA-FSIS. U.S. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Office of Public Health Science. MLG 5.09 - Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges - Effective Date: 01/15/2015. **FSIS Microbiology Laboratory Guidebook**. Disponível em: < <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/fsis-content/internet/main/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook/microbiology-laboratory-guidebook>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

USDA-FSIS. U.S. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). **Pre-Harvest Management Controls and Intervention Options for Reducing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Shedding in Cattle: An Overview of Current Research – August 2014a**. Disponível em: < <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d5314cc7-1ef7-4586-bca2-f2ed86d9532f/Reducing-Ecoli-Shedding-in-Cattle.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

USDA-FSIS. U.S. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Office of Public Health Science. MLG 5A.04 - FSIS Procedure for the Use of *Escherichia coli* O157:H7 Screening Tests for Meat Products and Carcass and Environmental Sponges - Effective Date: 06/29/2014b. **FSIS Microbiology Laboratory Guidebook**. Disponível em: < <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/fsis-content/internet/main/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook/microbiology-laboratory-guidebook>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

USDA-FSIS. U.S. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Office of Public Health Science. MLG 5B.05 - Detection and Isolation of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges - Effective Date: 06/29/2014c. **FSIS Microbiology**

Laboratory Guidebook. Disponível em: < <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/fsis-content/internet/main/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook/microbiology-laboratory-guidebook>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

USDA-FSIS. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products. **Rules and Regulations – Federal Register**, Washington, DC, 2012a. v.105, n.77, p.31975-31981. Disponível em: < <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/2010-0023FRN.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2016.

USDA-FSIS. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Office of Policy and Program Development. Office of Public Health Science: **Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC)** – May 2012b. Disponível em < http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/92de038d-c30e-4037-85a6-065c3a709435/Non_O157_STEC_Risk_Profile_May_2012.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 06 jun. 2014.

USDA-FSIS. U.S. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. **Federal Register**, Washington, DC, 1996. v.144, n.61, p.38805.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

VANAJA, S.; JANDHYALA, D.; MALLICK, E.; LEONG, J.; BALASUBRAMANIAN, S. Enterohemorrhagic and other Shigatoxin-producing *Escherichia coli*. In: Ed M. DONNENBERG. **Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis**. 2nd. Elsevier Inc., 2013.

VIDOVIC, S.; KORBER, D.R. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Saskatchewan cattle: Characterization of isolates by using random amplified polymorphic DNA PCR, antibiotic resistance profiles, and pathogenicity determinants. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p.4347-4355, 2006.

ZHANG, Y.; LAING, C.; STEELE, M.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, R.; BENSON, A.K.; TABOADA, E.; GANNON, V.P.J. Genome evolution in major *Escherichia coli* O157:H7 lineages. **BMC Genomics**, v.8, p.121-137, 2007.

WARRISS, P.D. **Meat Science: an introductory text**. 2.ed. Wallingford: CABI Publishing, 2010.

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

ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para a Revista Brasileira de Ciência Veterinária (RBCV) da Universidade Federal Fluminense (UFF). Normas para publicação disponíveis em: <<http://www.uff.br/rbcv/ojs/index.php/rbcv/index>>.

Jejum pré-abate de Nelores confinados e a excreção fecal de indicadores higiênico-sanitários e *E. coli* diarreogênicas

Pre-harvest fasting time of feedlot-finished Nellore cattle and shedding of hygienic-safety indicators and diarrheagenic E. coli

Jejum pré-abate de Nelores confinados e a excreção fecal de indicadores higiênico-sanitários e *E. coli* diarreio gênicas

Pre-harvest fasting time of feedlot-finished Nellore cattle and shedding of hygienic-safety indicators and diarrheagenic E. coli

Guilherme S. L. Sampaio^{1#}, Renata L. Lomele¹, Carolina T. Santos¹, Nara L.C. Delbem¹, Bruna D. Smaniotto¹, Roberto O. Roça², Camila D. Malossi³, João P. Araújo-Júnior⁴, Luzia A. Trinca⁵, Paulo R. L. Meirelles⁶, Luciana Miyagusku⁷, Ricardo S. Yamatogi⁸, Carlos A. Conte-Júnior⁹, Camila Brossi¹⁰

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, SP, Brasil.

² Departamento de Economia Sociologia e Tecnologia. Faculdade Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, SP, Brasil.

³ Instituto de Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, SP, Brasil.

⁴ Departamento de Microbiologia e Imunologia. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, SP, Brasil.

⁵ Departamento de Bioestatística. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, SP, Brasil.

⁶ Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal. Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, SP, Brasil.

⁷ Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). Campo Grande, MS, Brasil.

⁸ Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, MG, Brasil.

⁹ Departamento de Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal Fluminense (UFF). Niterói, RJ, Brasil.

¹⁰ Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo (USP). Pirassununga, SP, Brasil.

#Autor para correspondência: guilhermeslsampaio@gmail.com

RESUMO

Um total de 180 bovinos *Bos indicus* (Nelore), terminados em confinamento, foi dividido em grupos com 6, 12 ou 24 horas de jejum pré-abate para verificar se a redução deste tempo resulta em menor excreção fecal de indicadores higiênico-sanitários e *Escherichia coli* diarreiogênicas. Amostras de fezes pré e pós-jejum foram colhidas e analisadas para bactérias aeróbias mesófilas, *E. coli* genérica, coliformes totais, *E. coli* produtora de toxinas Shiga (STEC) e enteropatogênica (EPEC), assim como, pH e teores percentuais de matéria seca (MS%) e de fibras em detergente neutro (FDN%) e ácido (FDA%). Os dados foram analisados com análises de variância e regressões, ao nível de 5% de significância. A extensão do tempo de jejum pré-abate reduziu a MS%, mas elevou o pH, FDN% e FDA% das fezes. O gradual aumento do tempo de jejum pré-abate resultou em maior excreção fecal de STEC (*stx*₁ e *stx*₂), entretanto, houve

decréscimo de aeróbios mesófilos e redução de coliformes totais entre 6 e 12 horas jejum pré-abate, mas EPEC e *E. coli* genérica permaneceram constantes. Este estudo concluiu que a excreção fecal de STEC por Nelores terminados em confinamento pode ser minimizada com a redução do tempo de jejum pré-abate. Para as indústrias da carne isto pode representar a redução de custos operacionais e com a infraestrutura dos currais de abate. A redução de STEC, além de ser um fomento à saúde pública, constitui-se em um estímulo à economia brasileira pela redução de barreiras comerciais e menor devolução de mercadorias.

Palavras-chave: *Bos indicus*, curral de abate, EPEC, jejum, STEC

ABSTRACT

A total of 180 *Bos indicus* (Nelore) cattle finished in feedlot were divided into groups of 6, 12 or 24 hours of pre-harvest fasting to verify if time reduction results in lower hygienic-safety indicators and diarrheagenic *Escherichia coli* shedding. Pre-fasting and post-fasting samples of feces were collected and analyzed for mesophilic aerobic bacteria, generic *E. coli*, total coliforms, Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC), as well as pH and content percentage of dry matter (DM%), neuter detergent fiber (NDF%) and acid detergent fiber (ADF%). Data were analyzed with analyses of variance and regressions at 5% significance. The extension of time of pre-harvest fasting reduced DM% but increased pH, NDF% and ADF% of feces. The gradual increase of pre-harvest fasting resulted in greater STEC (*stx*₁ and *stx*₂) shedding. However, there was decrease in mesophilic aerobes and reduction of total coliforms between 6 and 12 hours, but EPEC and generic *E. coli* remained constants. In this study, it was concluded that pre-harvest fasting time reduction of

feedlot-finished Nellore cattle can reduce STEC shedding. For the meat industry, can represent a reduction of costs with operations and facilities of lairage pens. STEC reduction, besides being a development in public health, becomes a stimulus to the Brazilian economy by decreasing commercial barriers and return of goods.

Keywords: *Bos indicus*, EPEC, feces, lairage, STEC

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), emergiu como o maior risco associado às carnes vermelhas, tanto em aspectos de saúde pública, como em barreiras técnicas, comerciais e devoluções de mercadorias (EFSA, 2013a, 2013b; DUFFY et al., 2014), em vista disso, sete sorotipos de STEC foram declarados pelos Estados Unidos como adulterantes da carne bovina (USDA-FSIS, 2012a).

Os bovinos são os principais reservatórios naturais de STEC, além da *E. coli* enteropatogênica (EPEC), e estão epidemiologicamente relacionados à maioria dos surtos em humanos (BUNCIC et al., 2014; DUFFY et al., 2014; BAKER et al., 2016). As principais condutas de prevenção e controle estão relacionadas à reduzir a excreção fecal e à mitigar a contaminação da pele dos bovinos por estes patógenos, de modo a diminuir a contaminação das carcaças durante o processo de abate (POINTON et al., 2012; CALLAWAY et al., 2013; CROSSLAND et al., 2015).

Neste sentido, a realização do jejum alimentar pré-abate é considera crítica, visto que, ao mesmo tempo que reduz o volume do trato gastrointestinal e facilita o processo de evisceração, reduzindo o risco de falhas sanitárias operacionais e de contaminações pontuais de carcaças (POINTON et al., 2012). Também resulta na maior colonização do trato gastrointestinal e excreção fecal de patógenos, como a STEC, devido

1 principalmente, a absorção de ácidos orgânicos e a elevação do pH do trato
2 gastrointestinal (POINTON et al., 2012; CALLAWAY et al., 2013). Como agravantes,
3 as etapas de transporte e de curral de abate potencializam a contaminação da pele dos
4 bovinos devido a elevada densidade animal nestes ambientes, especialmente com a
5 maior duração destas etapas (ARTHUR et al., 2010; CALLAWAY et al., 2013).

6 A legislação brasileira exige a permanência mínima de 24 horas dos bovinos nos
7 currais de abate para a realização do chamado período de jejum, descanso e dieta
8 hídrica, podendo esse ser reduzido para 6 horas caso o tempo de transporte seja inferior
9 a 2 horas (BRASIL, 1952). Entretanto, convencionou-se pelas indústrias que os bovinos
10 sejam abatidos no dia posterior a sua chegada. Em contrapartida, em muitos países da
11 Europa e da América do Norte é comum que os animais sejam abatidos no mesmo dia
12 do desembarque (ARTHUR et al., 2007; DEWELL et al., 2008; FERGUSON;
13 WARNER, 2008). Além disso, a legislação europeia estabelece que os bovinos sejam
14 alimentados se o abate não ocorrer em até 12 horas de jejum no estabelecimento
15 (COMISSÃO EUROPEIA, 2009).

16 No Brasil, no que se refere ao período de jejum, descanso e dieta hídrica de
17 bovinos, permanecem conceitos antigos e restritivos a todas as situações produtivas, não
18 havendo um bom-senso técnico-científico. Desta forma, existe uma perceptível carência
19 de evidências científicas baseadas no cenário nacional que auxiliem na adequação deste
20 período nos mais diversos sistemas produtivos da carne bovina brasileira. Perante estes
21 aspectos, o presente estudo teve como objetivo verificar se a redução do tempo de jejum
22 pré-abate resulta em menor excreção fecal de indicadores higiênico-sanitários e *E. coli*
23 diarreiogênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brasil, conforme Protocolo nº 44/2015.

Este estudo foi composto por três abates de um lote de 60 bovinos que foi dividido aleatoriamente em três grupos (tratamentos), sendo: 20 bovinos com 6 horas, 20 com 12 horas e 20 com 24 horas de jejum pré-abate. Estes períodos contemplavam desde os desalojamentos da baia de confinamento até o abate dos bovinos. Ao término dos três abates foram utilizados 180 bovinos, totalizando 60 animais por tratamento.

Os três lotes foram fornecidos por uma propriedade rural situada no Município de Terenos, MS, entorno do Pantanal, e os três abates foram realizados em um abatedouro frigorífico, sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal – SIF, localizado no Município de Campo Grande, MS, distante 24 km da propriedade rural, via estrada pavimentada.

Os critérios de inclusão dos lotes foram bovinos *Bos indicus*, com predomínio da raça Nelore, machos, não castrados, com até quatro dentes permanentes, faixa de peso entre 480 e 540 kg e terminados em confinamento por 90 dias. A dieta fornecida aos bovinos foi composta, na proporção em matéria natural (M.N.%), por: 27,7% de silagem de capim, 37,6% de milho grão, 14,4% de glúten úmido de milho, 9% de caroço de algodão, 3,2% de casca de soja, 2,4% de torta de algodão, 2,2% de farelo de soja, 0,6% de uréia, 0,4% de Prote-N (Grasp) e 2,4% de núcleo confinamento.

No curral da propriedade rural, os animais dos tratamentos foram, individualmente, contidos em tronco de contenção para a colheita das fezes da ampola retal (pré-jejum). Amostragens das fezes pós-jejum foram realizadas na sala de abate logo após a inspeção das vísceras gastrointestinais pelo SIF. O tempo máximo entre a

colheita e o processamento das amostras não ultrapassou 24 horas, conforme recomendações da ISO 17604:2003 (ISO, 2003).

Todas as amostras foram diluídas (BRASIL, 2003), homogeneizadas e analisadas para contagem de bactérias aeróbias mesófilas segundo o método AOAC 990.12 (AOAC, 2012a) e ocorrências e contagens de *Escherichia coli* β -glucuronidase positiva (*E. coli* genérica) e de coliformes totais, respectivamente conforme os métodos AOAC 998.08 (AOAC, 2012b) e AOAC 991.14 (AOAC, 2012c), todos utilizando placas 3MTM PetrifilmTM.

O pH foi medido a partir de uma solução homogeneizada de 10 g de fezes com 10 ml de água destilada, utilizando peagômetro de punção direta com termômetro acoplado (Modelo HI 99163 - Hanna Instruments), previamente calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e 7,0 (Merck).

Foram selecionadas aleatoriamente 63 amostras de fezes pós-jejum e 18 amostras de fezes pré-jejum correspondentes. Destas foram realizadas a quantificação centesimal da matéria seca (MS) segundo método AOAC 934.01 (AOAC, 2012d), assim como, da fibra em detergente neutro (FDN) e da fibra em detergente ácido (FDA) segundo métodos descritos por Van Soest et al. (1991) e modificados por Berchielli et al. (2001), utilizando determinador de fibra (TE-149 - TECNAL).

Para as análises moleculares, o gene *rep* da região ORF-1 conservada do Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV-2) foi adicionado às amostras e utilizado como gene normalizador. Foram aceitas somente as extrações que apresentaram concentração viral de $4,2 \pm 0,2$ log cópias/ μ l após qPCR segundo Cruz e Araújo (2014). As amostras ainda congeladas foram pesadas (0,180 a 0,205 g) e o DNA foi extraído utilizando o kit

1 “QIAamp[®] Fast DNA Stool Mini Kit – QIAGEN”, com protocolo para detecção de
2 patógenos.

3 Todas as análises foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR
4 System (Applied Biosystems) com o 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems). Estas
5 tiveram a mistura de reação com volume final de 20 µl, sendo destes, 10 µl de GoTaq[®]
6 qPCR Master Mix (Promega) e 4,0 µl de amostra (DNA extraído). A concentração dos
7 iniciadores (“primers”) para os genes *rep* (Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002) e *eae*
8 (Hardeggen et al., 2010) foi de 0,25 µM e para os genes *stx*₁ (Bellin et al., 2001) e *stx*₂
9 (Yoshitomi et al., 2006) foi de 0,15 µM. A programação utilizada consistiu em 95°C por
10 10 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos,
11 sendo ao final, determinada a curva de dissociação.

12 A cepa EDL-933 (RILEY et al., 1983; PERNA et al., 2001) de *E. coli* STEC
13 O157:H7 foi adotada como controle positivo, e a cepa C-600 (APPLEYARD, 1953) de
14 *E. coli* como controle negativo, além de água “Nuclease-Free” (Promega). A
15 quantificação dos controles foi determinada por densidade óptica segundo Sezonov et
16 al. (2007), seguido de cultivo em ágar MacConkey (DifcoTM MacConkey Agar - BD)
17 conforme Feng et al. (2016).

18 As amostras positivas na triagem foram submetidas a quantificação. Foi utilizada
19 curva padrão de 6 pontos, em duplicata, preparadas com “pool” de amostras negativas,
20 as quais também foram utilizadas como terceiro controle negativo. A especificidade foi
21 estabelecida pelo pico de dissociação das amostras em relação ao pico do controle
22 positivo ($T_m \pm 1^\circ\text{C}$) e a sensibilidade por meio do “Ct endpoint” também do controle
23 positivo. Todas as análises tiveram curva padrão com $R^2 > 0,99$ e a eficiência da reação
24 situou-se entre 90 e 95% para os genes *stx*₂ e *eae*, entretanto, entre 80 e 85% para o gene

1 *stx*₁. As amostras com < 3,18 log cópias/g foram consideradas negativas e adotado o
2 valor “0” (zero) como resultado para os procedimentos estatísticos.

3 Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SAS versão 9.4 (TS
4 Level 1M2) considerando um nível de significância de 5%. Variáveis quantitativas
5 foram analisadas com modelos mistos de análise de variância e regressão utilizando o
6 procedimento Proc Mixed (SAS Institute, Cary, NC, USA), com o “tempo de jejum”
7 como efeito fixo, o “dia de abate” como efeito aleatório e o “animal” como unidade
8 experimental. Além disso, foi adicionado “momento de colheita” como medida repetida.
9 Foi utilizado “Kenward-Roger” para determinar os graus de liberdade e “Tukey-
10 Kramer” para ajustar as comparações múltiplas. As variáveis binárias foram analisadas
11 com modelos mistos generalizados logísticos com razão de chances utilizando o
12 procedimento Proc Glimmix (SAS Institute, Cary, NC, USA), com os mesmos efeitos e
13 ajustes descritos para as variáveis quantitativas. Predição linear marginal (“noblp”)
14 adicionada da fórmula “ $y = \exp(x)/[1+\exp(x)]$ ” foi utilizada para calcular as
15 ocorrências estimadas e os respectivos intervalos de confiança à 95% de probabilidade.
16 Análise dos resíduos foi utilizada em todos os modelos para validar cada modelo à cada
17 variável de modo a atender aos requisitos de normalidade e homocedasticidade.

19 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

20 O tempo de jejum pré-abate no presente estudo caracterizou-se por total jejum
21 alimentar e somente as duas primeiras horas também por jejum hídrico. A extensão do
22 tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas ocasionou redução do teor de MS% (Figura
23 01) e aumento dos teores de FDN% e FDA% (Figura 02) das fezes dos bovinos. Estes
24 resultados estão relacionados à degradação de carboidratos e proteínas solúveis pela

microbiota do trato gastrointestinal (TGI) e a absorção pelo animal dos produtos do metabolismo microbiano (BERCHIELLI et al., 2011). O que resultou no decréscimo do teor de MS%, conforme também verificado por Gregory et al. (2000) e Jacobson et al. (2002), e na concentração dos teores de FDN% e FDA%, que são compostos essencialmente por carboidratos estruturais e proteínas insolúveis, cujas degradações pela microbiota constituem-se em processos lentos e complexos (BERCHIELLI et al., 2011).

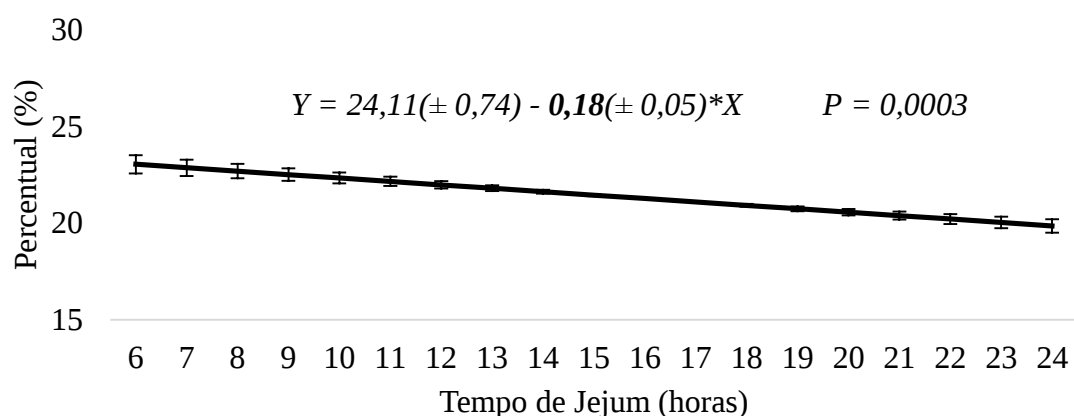


Figura 1 - Equação preditiva, com erro padrão, do percentual de matéria seca (MS%) das fezes de bovinos considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos. Sendo: “Y”, o valor do percentual de matéria seca (MS%) das fezes, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

A extensão do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas também resultou na gradual elevação do pH fecal (Figura 03). Dentre outros fatores, o pH do TGI está relacionado à concentração dos ácidos orgânicos voláteis (AOV) presentes, como acético, propiônico, butírico e lático, que são produtos do metabolismo microbiano e a principal fonte de energia para os animais ruminantes (BERCHIELLI et al., 2011). Portanto, durante o jejum alimentar provavelmente ocorreu a absorção de AOV, com o consequente aumento do pH fecal (CALLAWAY et al., 2013; POINTON et al., 2012).

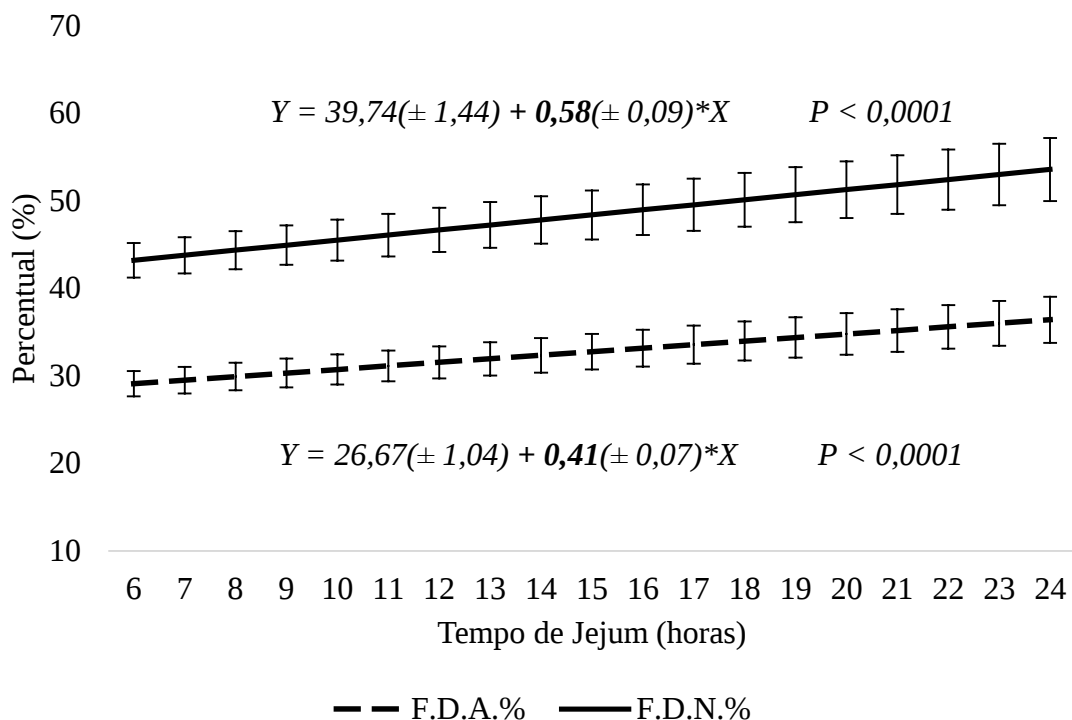


Figura 2 - Equação preditiva, com erro padrão, dos percentuais de fibra em detergente neutro (FDN%) e ácido (FDA%) das fezes de bovinos considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos. Sendo: “Y”, o valor percentual da referida fibra, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

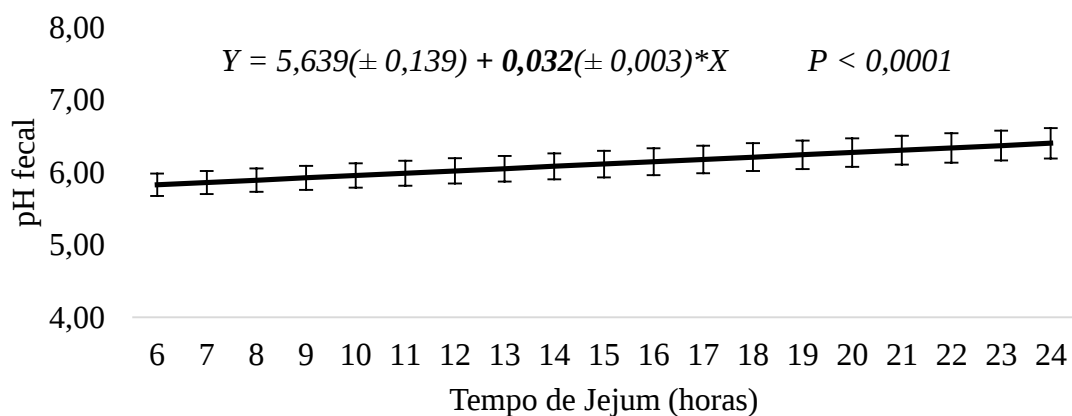


Figura 3 - Equação preditiva, com erro padrão, do pH fecal de bovinos considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos. Sendo: “Y”, o valor do pH fecal, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

O decréscimo de aeróbios mesófilos nas fezes ao longo do jejum alimentar (Figura 04), pode estar relacionado a menor disponibilidade de nutrientes para a manutenção da microbiota, principalmente no intestino grosso (BERCHIELLI et al., 2011). Entretanto, Gregory et al. (2000) verificou aumento de aeróbios mesófilos nas fezes em bovinos *Bos tauros* (Angus) criados em pastagem e submetidos à 42 horas de jejum alimentar, sendo 24 h na baia, 2 h de transporte e mais 16 h de curral de abate. Esta discordância pode estar relacionada a diferenças na dieta, uma vez que os animais do presente estudo receberam dieta com 30% de volumoso e 70% de concentrado, a qual apresenta maior taxa fermentativa ruminal e biodisponibilidade, o que resulta em menor produção de fezes (BERCHIELLI et al., 2011).

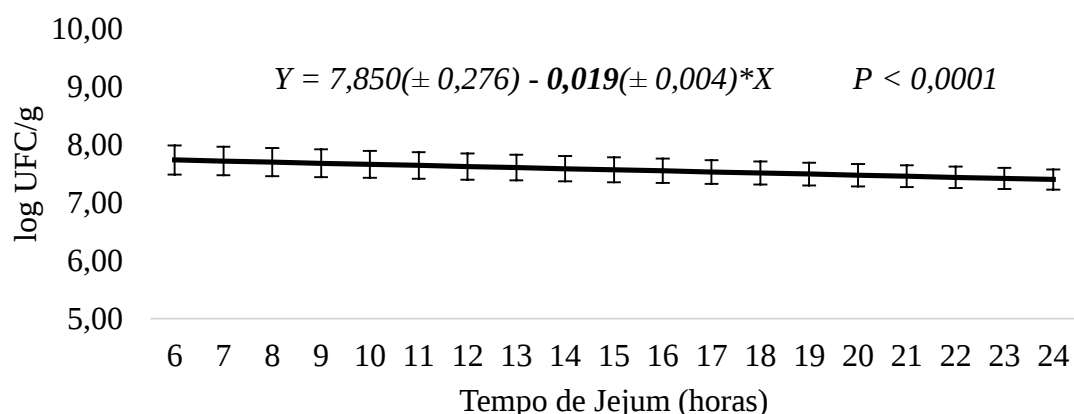


Figura 4 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de bactérias aeróbias mesófilas das fezes dos bovinos, considerando o tempo de jejum pré-abate ao qual foram submetidos. Sendo: “Y”, a contagem em log UFC/g de bactérias aeróbias mesófilas das fezes, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

Conforme explanado por Callaway et al. (2013) e Pointon et al. (2012), os principais limitantes à proliferação de *E. coli* genérica e *E. coli* O157:H7 no TGI de bovinos são o baixo pH e a alta concentração de AOV devido a sua citotoxicidade. Portanto, a porção final do intestino grosso constitui-se no principal local de

colonização e multiplicação de *E. coli* O157:H7, devido ao pH mais elevado e à menor concentração de AOV (GRAUKE et al., 2002; CALLAWAY et al., 2013).

Por este motivo, a extensão do tempo de jejum alimentar tem sido associada ao aumento da concentração gastrointestinal de enterobactérias e *E. coli* genérica (GREGORY et al., 2000; CALLAWAY et al., 2013), assim como, maior ocorrência e concentração intestinal de *E. coli* O157:H7 (BUCHKO et al., 2000; CALLAWAY et al., 2013; POINTON et al., 2012).

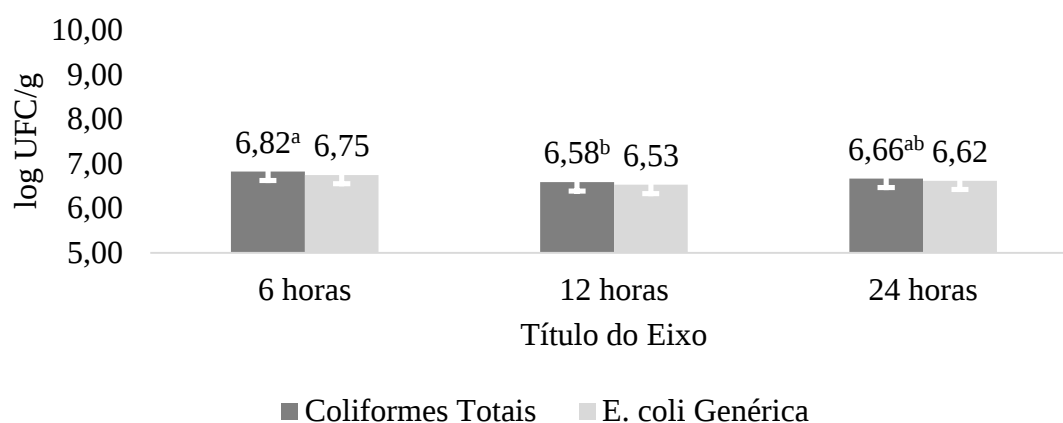


Figura 5 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio das contagens de *E. coli* genérica e coliformes totais nas fezes de bovinos submetidos à diferentes períodos de jejum pré-abate.
^{a,b,c} Valores com letras distintas para o mesmo indicador são diferentes ($P < 0,05$).

Entretanto, no presente estudo, a extensão do jejum pré-abate entre 6 e 24 horas não influenciou na concentração de *E. coli* genérica e pouco alterou a excreção de coliformes totais (Figura 05). Por outro lado, houve aumento do pH fecal (Figura 03), indicando possível redução de AOV, o que deveria resultar em maior concentração destes indicadores nas fezes (GREGORY et al., 2000), principalmente por serem bovinos terminados com dieta composta por 70% de concentrado e 30% de volumoso, que resulta em menor concentração de AGV no intestino grosso em relação à dieta

composta por pastagem (CALLAWAY et al., 2013). Todavia, enquanto foi observado constante concentração de *E. coli*, a concentração de bactérias aeróbias mesófilas decresceu ao longo do tempo de jejum, o que poderia indicar um favorecimento do ambiente intestinal para a manutenção de *E. coli* genérica.

Esta discordância também pode estar relacionada com possíveis componentes inibitórios presentes na dieta fornecida aos animais (CALLAWAY et al., 2013). Visto que, pouco se sabe sobre a interferência de alguns resíduos agrícolas utilizados na nutrição de bovinos, como caroço e polpa de algodão, assim como casca e farelo de soja, sobre a ecologia da *E. coli* no TGI e que são amplamente utilizados na pecuária intensiva brasileira (GERON et al., 2014).

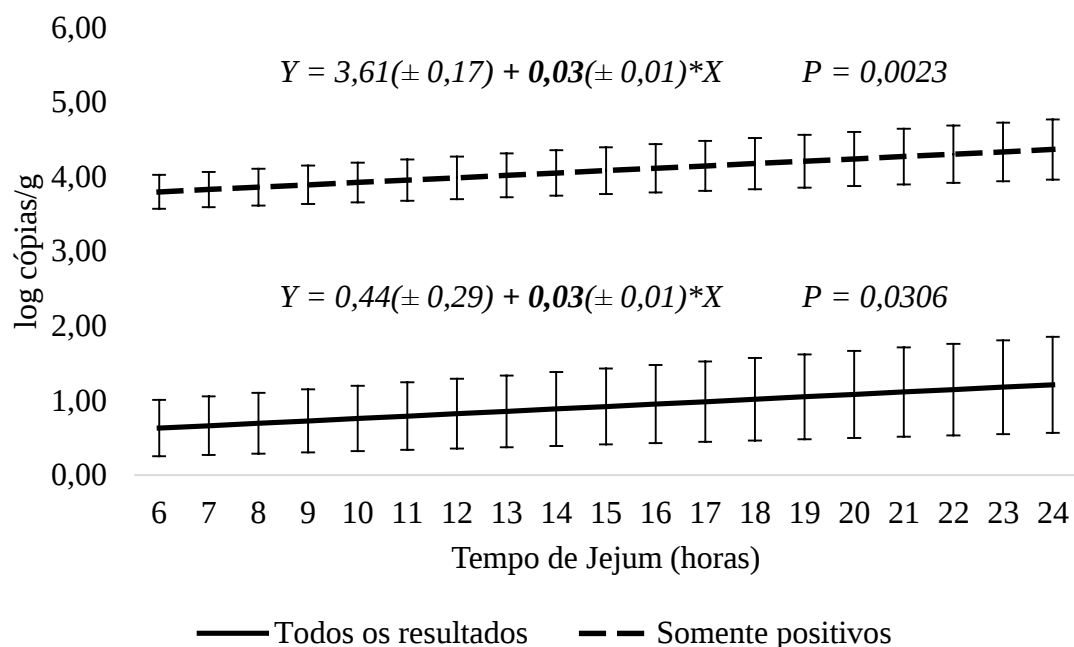
Conforme explanado por Callaway et al. (2013) e Nastasijevic et al. (2014), devido a sua importância econômica e em saúde pública, existe um vasto conhecimento a respeito da ecologia da *E. coli* O157:H7 no trato gastrointestinal dos bovinos e dos aspectos epidemiológicos. Entretanto, neste sentido, pouco se sabe sobre os demais sorogrupos de STEC e EPEC (MONAGHAN et al., 2011; MOXLEY; SMITH, 2010; POLIFRONI et al., 2012).

Em vista disso, muitos dos resultados apresentados neste estudo para STEC (stx1 e stx2) e EPEC são inéditos e para a discussão dos mesmos foi utilizado o conhecimento existente para *E. coli* O157:H7.

A extensão do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas aumentou a concentração de STEC, tanto para stx₁ (Figura 06) como stx₂ (Figura 07) nas fezes dos bovinos. Entretanto, não foram detectadas diferenças na concentração de EPEC (Tabela 01). Estes resultados de STEC corroboram com os existentes para *E. coli* O157:H7 (BUCHKO et al., 2000; CALLAWAY et al., 2013; POINTON et al., 2012),

1 demonstrando que o jejum alimentar também favorece a concentração de STEC nas
2 fezes.

3



4

5 Figura 6 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de STEC (*stx*₁) das fezes,
6 considerando ou não os resultados negativos, em relação ao tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos
7 foram submetidos.

8 Sendo: “Y”, a contagem média em log cópias/g de STEC (*stx*₁) nas fezes, e “X”, o tempo de jejum pré-
9 abate em horas.

10

11 Além disso, o fato preocupante dos bovinos positivos terem apresentado pelo
12 menos 3,6 log de STEC (*stx*₁ e *stx*₂) por grama de fezes, com alguns animais, inclusive,
13 excretando mais de 6 log/g, remete a necessidade de estudos adicionais para a
14 caracterização e a mitigação desta população de STEC, perante a sua importância
15 econômica e em saúde pública, principalmente em relação ao gene *stx*₂, que está
16 incriminado a maioria dos surtos severos com a necessidade de hospitalização
17 (ARTHUR et al., 2010; MUNNS et al., 2015; USDA-FSIS, 2012a, 2012b).

18 Estudos têm indicado um efeito paradoxal do jejum pré-abate, visto que, essa
19 maior excreção fecal de *E. coli* O157:H7 pode estar associada tanto à redução de AOV

no TGI, como à imunossupressão induzida por estresse que ocorre durante o período pré-abate (CROSSLAND et al., 2015). Além de desconhecido para STEC, este segundo efeito pode ser especialmente importante na pecuária brasileira, visto que, mais de 80% do rebanho bovino brasileiro é composto por animais *Bos indicus*, principalmente da raça Nelore (FERRAZ; FELICIO, 2010) e que são caracterizados pela maior reatividade e susceptibilidade ao estresse em relação aos animais *Bos taurus* (SILVEIRA et al., 2008).

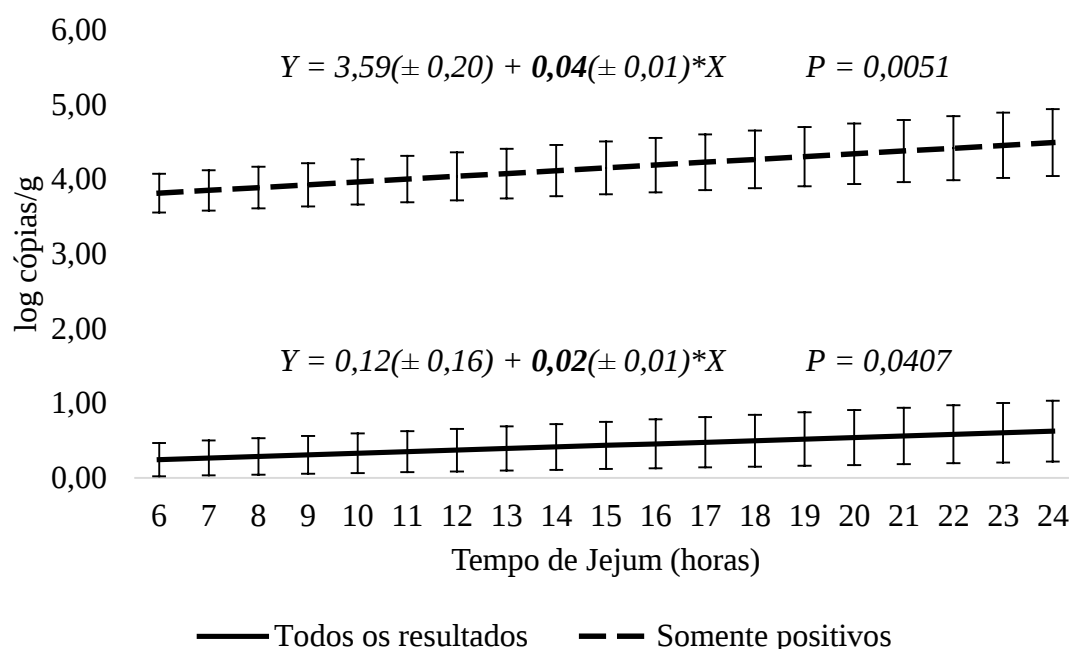


Figura 7 - Equação preditiva, com erro padrão, da contagem média de STEC (*stx*₂) das fezes, considerando ou não os resultados negativos, em relação ao tempo de jejum pré-abate ao qual os bovinos foram submetidos.

Sendo: “Y”, a contagem média em log cópias/g de STEC (*stx*₂) nas fezes, e “X”, o tempo de jejum pré-abate em horas.

Nesta pesquisa, embora descritivamente evidente, não foi detectado aumento, ao nível de 5% de significância, nas ocorrências de STEC (*stx*₁ e *stx*₂) e EPEC nas fezes dos bovinos (Tabela 02). Entretanto, estes resultados sinalizam um possível aumento de bovinos colonizados e excretando STEC e EPEC devido a extensão do jejum alimentar

entre 6 e 24 horas. O que corrobora com Kudva et al. (1995) para *E. coli* O157:H7 e reforça a necessidade de estudos adicionais para a caracterização e mitigação destes patógenos.

Tabela 1 - Média dos Quadrados Mínimos e Erro Padrão Médio da contagem de EPEC nas fezes dos bovinos

Parâmetros	Tempo de Jejum			EPM*	Valor <i>P</i>
	6 horas	12 horas	24 horas		
EPEC (<i>eae</i>)	0,63	0,98	0,98	0,19	0,2960
#EPEC (<i>eae</i>)	3,91	4,30	4,01	0,17	0,2218

* Erro padrão médio.

Considerando somente os resultados positivos.

Esses aumentos na ocorrência e na concentração de STEC são preocupantes, principalmente no que se refere ao fator de virulência *stx*₂, que esta relacionado ao aumento da patogenicidade e frequentemente associado à surtos severos e mortes em humanos, principalmente devido a Síndrome Hemolítica Urêmica – SHU, que acomete, principalmente, crianças, idosos e imunocomprometidos (HE et al., 2012; KARMAI et al., 2010).

Tabela 2 – Ocorrência estimada (%), com Intervalo de Confiança (95%), de STEC e EPEC nas fezes dos bovinos

Parâmetros	Tempo de Jejum			Valor <i>P</i>
	6 horas	12 horas	24 horas	
EPEC (<i>eae</i>)	15,83 (9,51 – 25,19)	22,5 (14,86 – 32,56)	24,42 (16,43 – 34,69)	0,3541
STEC (<i>stx</i> ₁)	17,32 (8,76 – 31,94)	22,31 (11,98 – 38,28)	27,59 (15,46 – 44,47)	0,3144
STEC (<i>stx</i> ₂)	6,67 (3,01 – 14,13)	9,17 (4,68 – 17,19)	14,25 (8,38 – 23,19)	0,2412

CONCLUSÕES

Nas condições estabelecidas por este estudo, a redução do tempo de jejum pré-abate entre 6 e 24 horas de bovinos *Bos indicus* (Nelore), terminados em confinamento, reduz a excreção de STEC, o que pode repercutir em menor disseminação e contaminação da pele dos bovinos e, conseqüentemente, das carcaças.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

REFERÊNCIAS

- APPLEYARD, R. K. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics*, v. 39, n. 4, p. 440, 1954.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 19 ed. Official Method 990.12. Gaithersburg:AOAC INTERNATIONAL, 2012a.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 19 ed. Official Method 998.08. Gaithersburg:AOAC INTERNATIONAL, 2012b.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 19 ed. Official Method 991.14. Gaithersburg:AOAC INTERNATIONAL, 2012c.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 19 ed. Official Method 934.01. Gaithersburg:AOAC INTERNATIONAL, 2012d.
- ARTHUR, T.M.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; BOLISEVAC, J.M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, L.; KOOHMARAIE, M. Super shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle and the impact on beef carcass contamination. *Meat Science*, v.86, p.32-37, 2010.
- ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; BRICHTA-HARHAY D.M.; GUERINI, M.N.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.D. Transportation and lairage environment effects on prevalence, numbers, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on hides and carcasses of beef cattle at processing. *Journal of Food Protection*, v.70, n.2, p.280-286, 2007.
- BAKER, C.A.; RUBINELLI, P.M.; PARK, S.H.; CARBONERO, F.; RICKE, S.C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. *Food Control*, v.59, p.407-419, 2016.

- 1 BELLIN, T.; PULZ, M.; MATUSSEK, A.; HEMPEN, H.G.; GUNZER, F. Rapid
2 detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent
3 hybridization probes. *Journal of clinical microbiology*, v.39, n.1, p.370-374, 2001.
- 4 BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. *Nutrição de ruminantes*. 2.ed.
5 Jaboticabal:Funep, 2011. 616p.
- 6 BERCHIELLI, T.T.; SADER, A.D.O.; TONANI, F.L.; PAZIANI, S.D.F.; ANDRADE,
7 P.D. Avaliação da determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente
8 ácido pelo sistema ANKOM. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, n.5, p.1572-1578,
9 2001.
- 10 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa
11 Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos
12 Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e
13 Água. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF, 2003
- 14 BRASIL. Decreto nº. 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Regulamento da
15 Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial [da]*
16 *União*, Rio de Janeiro, RJ, v.155, p.10.785, 7 jul. 1952. Seção 1.
- 17 BUCHKO, S. J.; HOLLEY, R. A.; OLSON, W. O.; GANNON, V. P. J.; VIEIRA, D. M.
18 The effect of fasting and diet on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle.
19 *Canadian Journal of Animal Science*, v.80, p.741-744, 2000.
- 20 BUNCIC, S.; NYCHAS, G.; LEE, M.R.F.; KOUTSOUMANIS, K.; HÉBRAUD, M.;
21 DESVAUX, M.; CHORIANOPOULOS, N.; BOLTON, D.; BLAGOJEVIC, B.;
22 ANTIC, D. Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances.
23 *Meat Science*, v.97, p.288-297, 2014.
- 24 CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; LONERAGAN, G. H.; CARR, M. A.;
25 NISBET, D. J. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) ecology in cattle and
26 management based options for reducing fecal shedding. *Agriculture. Food and*
27 *Analytical Bacteriology Journal*, v. 3, p. 39-69, 2013.
- 28 COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 1099/2009 do Conselho de 24 de set.
29 de 2009. Relativo à proteção dos animais no momento da occisão. *Jornal Oficial da*
30 *União Europeia*, Bruxelas, p.L303/01-L303/30, 18 nov. 2009.
- 31 CROSSLAND, W.L.; CALLAWAY, T.R.; TEDESCHI, L.O. *Shiga toxin-producing E.*
32 *coli* and ruminant diets: A match made in heaven? In: Food Safety: Emerging Issues,
33 Technologies and Systems, p.185-214, 2015.
- 34 CRUZ, T.F.; ARAUJO, J.P. Cultivation of PCV2 in swine testicle cells using the shell
35 vial technique and monitoring of viral replication by qPCR and RT-qPCR. *Journal of*
36 *virological methods*, v.196, p.82-85, 2014.
- 37 DEWELL, G.A.; SIMPSON, C.A.; DEWWEL, R.D.; HYATT, D.R.; BELK, K.E.;
38 SCANGA, J.A.; MORLEY, P.S.; GRANDIN, T.; SMITH, G.C.; DARGATZ, D.A.;
39 WAGNER, B.A.; SALMAN, M.D. Impact of transportation and lairage on hide
40 contamination with *Escherichia coli* O157 in finished beef cattle. *Journal of Food*
41 *Protection*, v.71, n.6, p.1114-1118, 2008.

- 1 DUFFY, G.; BURGESS, C.M.; BOLTON, D.J. A review of factors that effect
2 transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to
3 fork beef chain. *Meat Science*, v.97, p.375-383, 2014.
- 4 EFSA. European Food Safety Authority. The European Union summary report on
5 trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011.
6 *EFSA Journal* 2013, v.11, n.4, 2013a. 250p.
- 7 EFSA. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the public health hazards
8 to be covered by inspection of meat (bovine animals). *EFSA Journal* 2013, v.11, n.6,
9 2013b. 261p.
- 10 FENG, P.; WEAGANT, S.D.; JINNEMAN, K. Chapter 4A - Diarrheagenic *Escherichia*
11 *coli*, Updated June 2016. *FDA Bacteriological Analytical Manual Online (BAM)*.
12 Disponível em: < [http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/](http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm)
13 [ucm070080.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm)>. Acesso em: 27 out. 2016.
- 14 FERGUSON, D. M.; WARNER, R. D. Have we underestimated the impact of pre-
15 slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Science*, v.80, n.1, p.12-19, 2008.
- 16 FERRAZ, J.B.S.; FELÍCIO, P.E. Production systems—An example from Brazil. *Meat*
17 *science*, v.84, n.2, p.238-243, 2010.
- 18 GERON, L. J. .; MOURA, D. C.; RODRIGUES, D. N.; PAULA, E. J. H.;
19 TRAUTMANN-MACHADO, R. J.; GARCIA, J.; SILVA, D. A. *Semina: Ciências*
20 *Agrárias*, v. 35, n. 4, p. 2673-2684, 2014.
- 21 GRAUKE, L.J.; KUDVA, I.T.; YOON, J.W.; HUNT, C.W.; WILLIAMS, C.J.;
22 HOVDE, C.J. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants.
23 *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.2269-2277, 2002.
- 24 GREGORY, N.G.; JACOBSON, L.H.; NAGLE, T.A.; MUIRHEAD, R.W.; LEROUX,
25 G.J. Effect of preslaughter feeding system on weight loss, gut bacteria, and the
26 physicochemical properties of digesta in cattle. *New Zealand Journal of Agricultural*
27 *Research*, v.43, p.351-361, 2000.
- 28 HARDEGEN, C.; MESSLER, S.; HENRICH, B.; PFEFFER, K.; WÜRTHNER, J.;
29 MACKENZIE, C.R. A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection
30 of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC
31 and EAEC in a university hospital. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*,
32 v.9, n.1, p.1, 2010.
- 33 HE, X.; QUIÑONES, B.; MCMAHON, S.; MANDRELL, R. E. A single-step
34 purification and molecular characterization of functional Shiga toxin 2 variants from
35 pathogenic *Escherichia coli*. *Toxins*, v.4, n.7, p.487-504, 2012.
- 36 ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. (ISO)
37 17604:2003(E). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – carcass sampling for*
38 *microbiological analysis*. Switzerland, 2003. 14 p.
- 39 JACOBSON, L.H.; NAGLE, T.A.; GREGORY, N.G.; BELL, R.G.; LE ROUX, G.;
40 HAINES, J.M. Effect of feeding pasture-finished cattle different conserved forages on
41 *Escherichia coli* in the rumen and faeces. *Meat Science*, v.62, p.93-106, 2002.
- 42 KARMALI, M.A.; GANNON, V.; SARGEANT, J.M. Verocytotoxin-producing
43 *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, v.140, n.3, p.360-370, 2010.

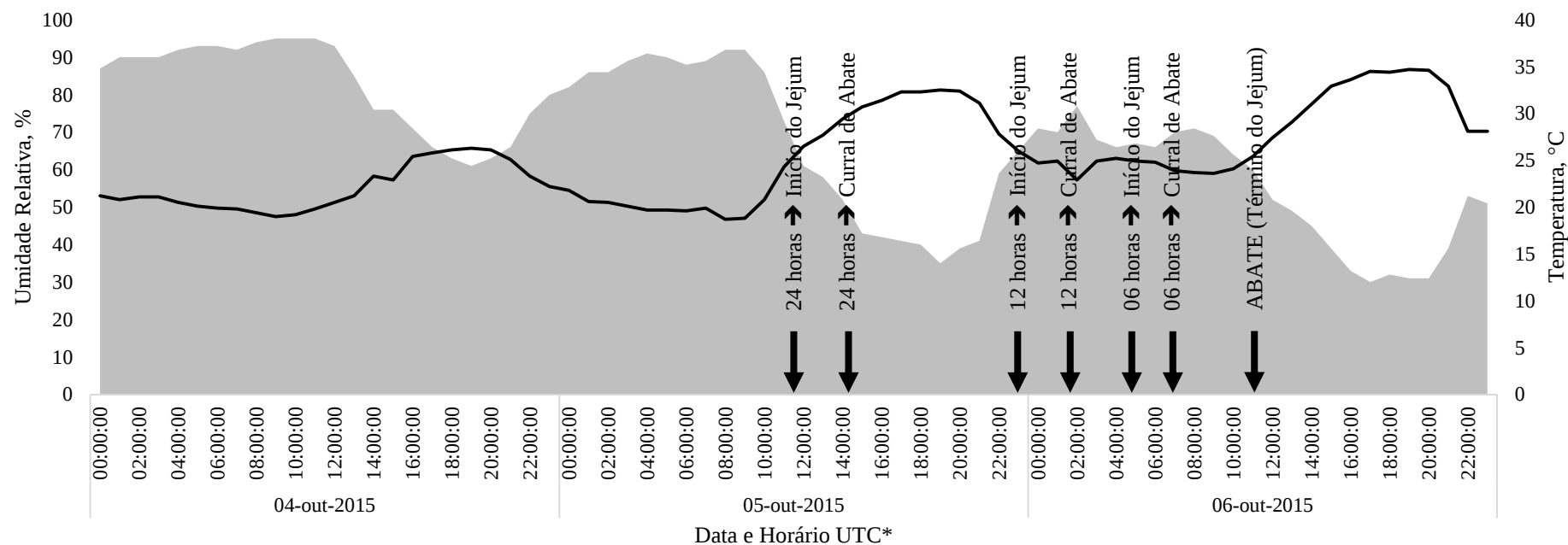
- 1 KUDVA, I. T.; HATFIELD, P.G.; HOVDE, C.J. Effect of diet on the shedding of
2 Escherichia coli O157:H7 in a sheep model. *Applied Environmental Microbiology*, v.
3 61, p.363-1370, 1995.
- 4 LADEKJÆR-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T.; STORGAARD, T.;
5 KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.; BØTNER, A.
6 Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in
7 immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally
8 infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary microbiology*, v.89, n.2,
9 p.97-114, 2002.
- 10 MONAGHAN, A. I.; BYRNE, B.; FANNING, S.; SWEENEY, T.; MCDOWELL, D.
11 BOLTON, D. J. Serotypes and virulence profiles of non-O157 shiga toxin-producing
12 Escherichia coli isolates from bovine farms. *Applied and Environmental Microbiology*,
13 v.77, p. 8662-8668, 2011.
- 14 MOXLEY, R.A.; SMITH, D.R. Attaching-effacing Escherichia coli infections in cattle.
15 *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.26, n.1, p.29-56, 2010.
- 16 MUNNS, K. D.; SELINGER, L. B.; STANFORD, K.; GUAN, L.; CALLAWAY, T. R.;
17 MCALLISTER, T. A. Perspectives on super-shedding of Escherichia coli O157: H7 by
18 cattle. *Foodborne pathogens and disease*, v. 12, n. 2, p. 89-103, 2015.
- 19 NASTASIJEVIĆ, I.; MITROVIĆ, R.; JANKOVIĆ, V. STEC in the beef chain: One
20 health approach. *Tehnologija mesa*, v. 55, n. 2, p. 93-116, 2014.
- 21 PERNA, N. T.; PLUNKETT, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE,
22 D. J.; MAYHEW, G.F.; EVANS, P.S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H.A.; POÂ
23 SFAI. G.R.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN A.; SHAO, Y.; MILLER, L.;
24 GROTEBECK, E.J.; DAVIS, N.W.; LIMK, A.; DIMALANTAK, E.T.; POTAMOUSIS,
25 K.D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T.A.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ,
26 D.C.; WELCHI, R.A.; PÓSFAL, G. Genome sequence of enterohaemorrhagic
27 Escherichia coli O157:H7. *Nature*, v. 409, n. 6819, p. 529-533, 2001.
- 28 POINTON, A.; KIERMEIER, A.; FEGAN, N. Review of the impact of pre-slaughter
29 feed curfews of cattle, sheep and goats on food safety and carcass hygiene in Australia.
30 *Food Control*, v.26, p.313-321, 2012.
- 31 POLIFRONI, R.; ETCHEVERRÍA, A. I.; SANZ, M. E.; CEPEDA, R. E.; KRÜGER,
32 A.; LUCCHESI, P. M. A.; FERNÁNDEZ, D.; PARMA, A.E.; PADOLA, N.L.
33 Molecular characterization of shiga toxin-producing Escherichia coli Isolated from the
34 environment of a dairy farm. *Current Microbiology*,. v.65, n.337, p.1-7, 2012.
- 35 RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.;
36 DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N.
37 T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare
38 Escherichia coli Serotype. *The New England Journal of Medicine*, v. 308, p.681-685,
39 1983.
- 40 SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. Escherichia coli physiology in
41 Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology*, v.189, n.23, p.8746-8749, 2007.
- 42 SILVEIRA, I. D. B.; FISCHER, V.; FARINATTI, L. H. E.; RESTLE, J.; ALVES
43 FILHO, D. C. *Revista brasileira de zootecnia*, v. 37, n. 10, p. 1808-1814, 2008.

- 1 USDA-FSIS. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection
2 Service (FSIS). *Shiga toxin-producing Escherichia coli in certain raw beef products.*
3 *Rules and Regulations – Federal Register*, Washington, DC, 2012a. v.105, n.77,
4 p.31975-31981. Disponível em: < [http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/2010-](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/2010-0023FRN.pdf)
5 [0023FRN.pdf](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/2010-0023FRN.pdf)>. Acesso em: 30 out. 2016.
- 6 USDA-FSIS. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection
7 Service (FSIS). Office of Policy and Program Development. Office of Public Health
8 Science: *Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli*
9 *(non-O157 STEC) – May 2012b*. Disponível em < [http://www.fsis.usda.](http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/92de038d-c30e-4037-85a6-065c3a709435/Non_O157_STEC_Risk_Profile_May_2012.pdf?MOD=AJPERES)
10 [gov/wps/wcm/connect/92de038d-c30e-4037-85a6-](http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/92de038d-c30e-4037-85a6-065c3a709435/Non_O157_STEC_Risk_Profile_May_2012.pdf?MOD=AJPERES)
11 [065c3a709435/Non_O157_STEC_Risk_Profile_May 2012.pdf?MOD=AJPERES](http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/92de038d-c30e-4037-85a6-065c3a709435/Non_O157_STEC_Risk_Profile_May_2012.pdf?MOD=AJPERES)>.
12 Acesso em: 06 jun. 2014.
- 13 VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Symposium: carbohydrate
14 methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *Journal of Dairy*
15 *Science*, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- 16 YOSHITOMI, K.J.; JINNEMAN, K.C.; WEAGANT, S.D. Detection of Shiga toxin
17 genes stx1, stx2, and the+ 93 uidA mutation of E. coli O157: H7/H-using SYBR®
18 Green I in a real-time multiplex PCR. *Molecular and cellular probes*, v.20, n.1, p.31-41,
19 2006.

ANEXOS

ANEXO 01

Segundo dados do INMET, os 30 dias que antecederam ao primeiro abate (06/10/2015) tiveram precipitação acumulada de 237,4 mm (sendo 9 dias com a ocorrência de chuva), entretanto, não houve precipitação nos três dias que antecederam o abate.



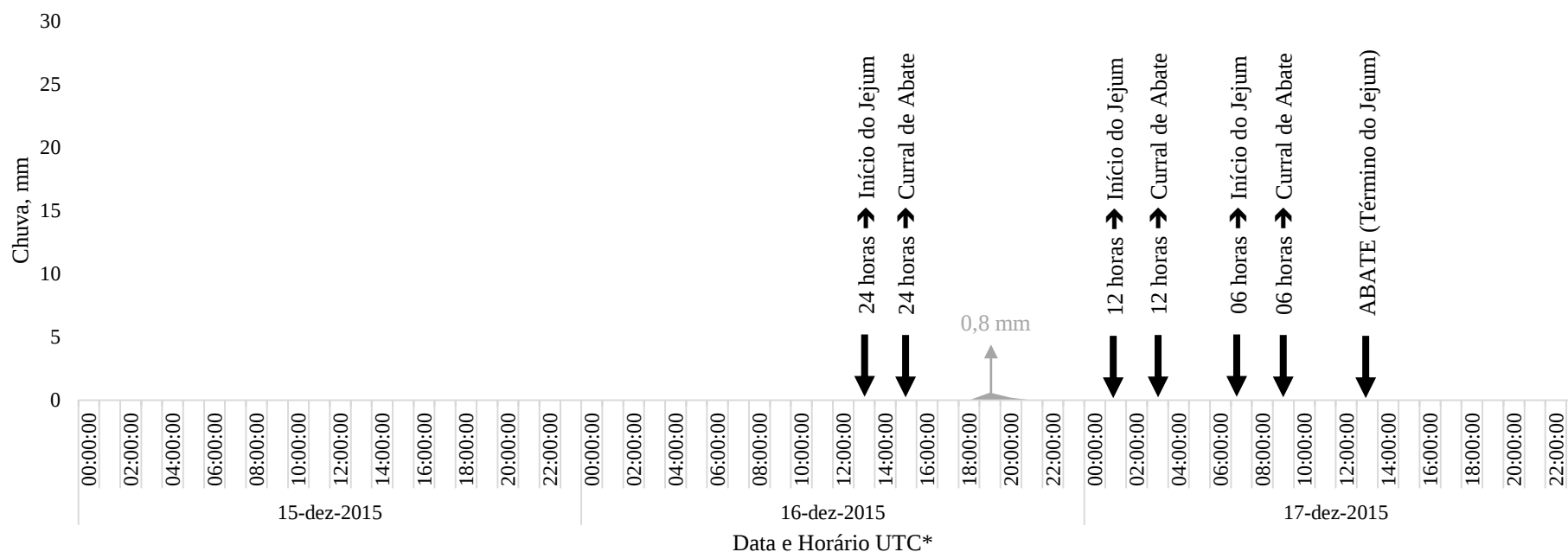
Estruturação dos tratamentos (grupos de bovinos com 6, 12 e 24 horas de jejum alimentar pré-abate), assim como, temperatura e umidade relativa ambiente dos três dias que antecederam ao primeiro abate.

*Os dados estão em horário Tempo Universal Coordenado (UTC), para o horário de Campo Grande, MS, basta subtrair duas horas.

1 ANEXO 02

2 Segundo dados do INMET, os 30 dias que antecederam ao segundo abate (17/12/2015) tiveram precipitação acumulada de 145,6 mm
3 (sendo 14 dias com a ocorrência de chuva).

4

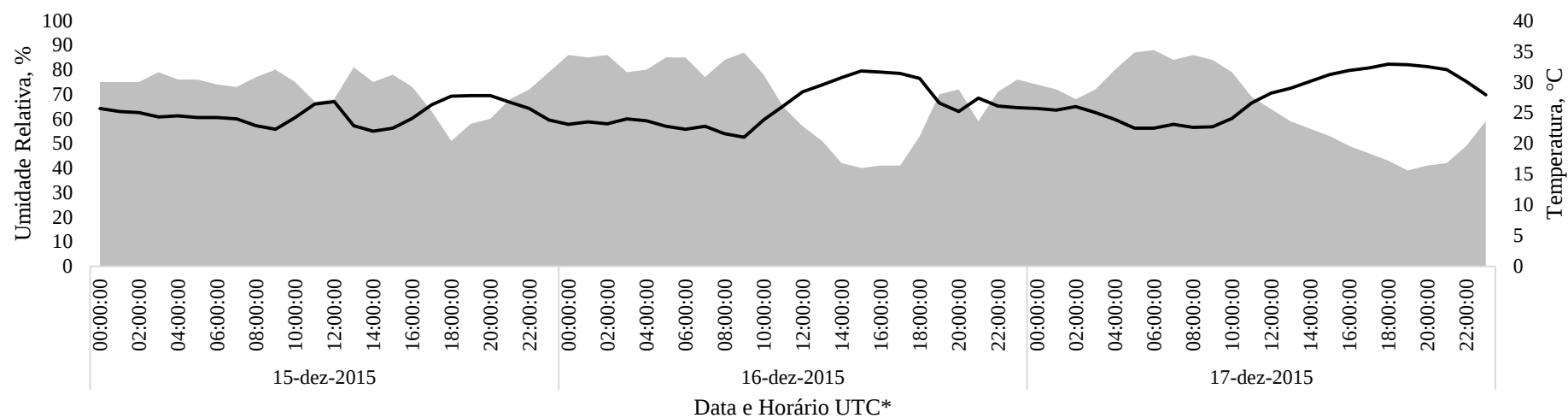


5 Estruturação dos tratamentos (grupos de bovinos com 6, 12 e 24 horas de jejum alimentar pré-abate), assim como, precipitação de chuva dos três dias que antecederam ao
6 segundo abate.

7 *Os dados estão em horário Tempo Universal Coordenado (UTC), para o horário de Campo Grande, MS, basta subtrair duas horas.

8

9



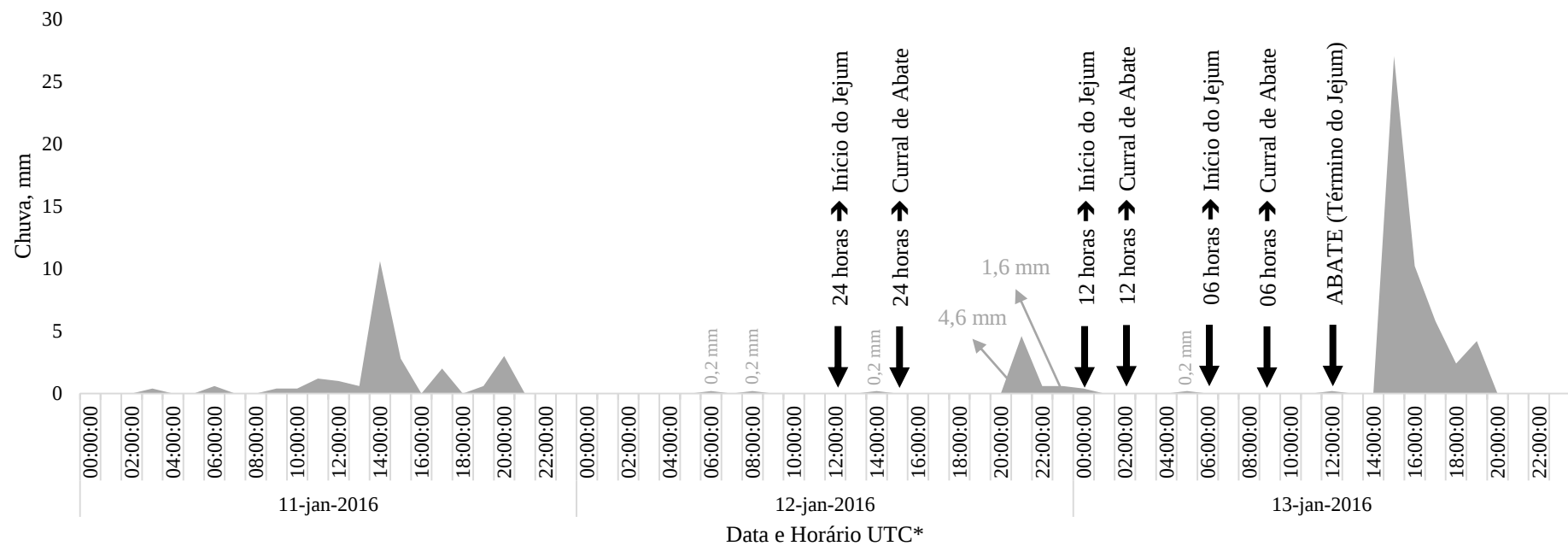
1
2
3
4

Temperatura e umidade relativa ambiente dos três dias que antecederam ao segundo abate.

*Os dados estão em horário Tempo Universal Coordenado (UTC), para o horário de Campo Grande, MS, basta subtrair duas horas.

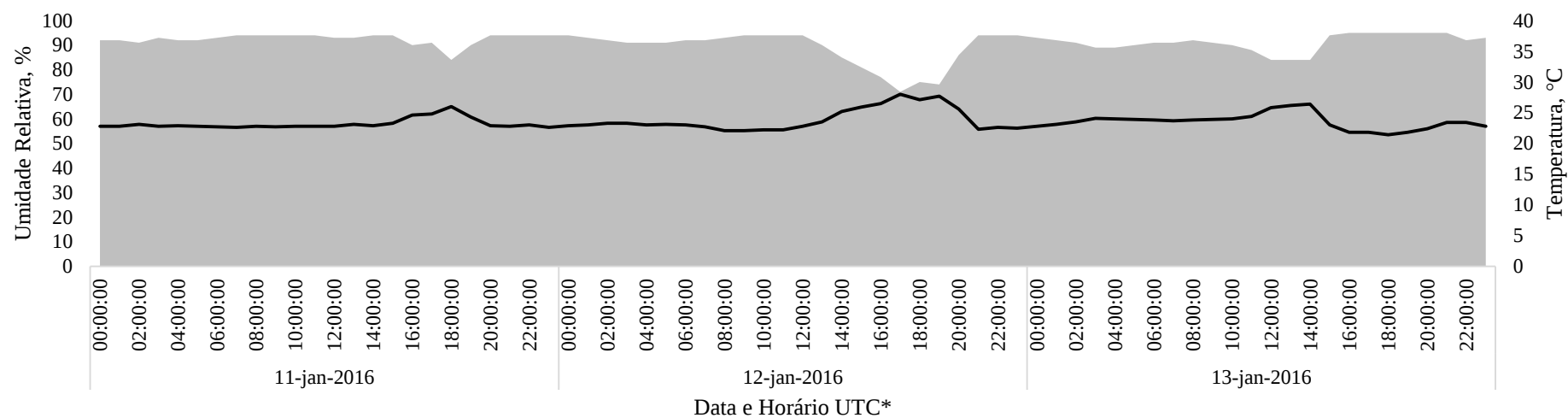
ANEXO 03

Segundo dados do INMET, os 30 dias que antecederam ao terceiro e último abate (13/01/2016) tiveram precipitação acumulada de 388,8 mm (sendo 26 dias com a ocorrência de chuva).



Estruturação dos tratamentos (grupos de bovinos com 6, 12 e 24 horas de jejum alimentar pré-abate), assim como, precipitação de chuva dos três dias que antecederam ao terceiro abate.

*Os dados estão em horário Tempo Universal Coordenado (UTC), para o horário de Campo Grande, MS, basta subtrair duas horas.



- 1
- 2 Temperatura e umidade relativa ambiente dos três dias que antecederam ao terceiro abate.
- 3 *Os dados estão em horário Tempo Universal Coordenado (UTC), para o horário de Campo Grande, MS, basta subtrair duas horas.