

FREDERICO GERMANO PISCITELLI ALVARENGA LANNA

Escherichia coli PATOGÊNICAS E MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE
HIGIENE EM LINHAS DE ABATE DE BOVINOS E PROCESSAMENTO DA
CARNE

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

T

L929e
2013

Lanna, Frederico Germano Piscitelli Alvarenga, 1986-
Escherichia coli patogênicas e micro-organismos indicadores de
higiene em linhas de abate de bovinos e processamento da carne / Frederico
Germano Piscitelli Alvarenga Lanna. - Viçosa, MG, 2013.
viii, 55 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luis Augusto Nero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli*. 2. Carne bovina - Contaminação. 3. Matadouros
- Inspeção. 4. Higiene - Indicadores. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.2089

FREDERICO GERMANO PISCITELLI ALVARENGA LANNA

***Escherichia coli* PATOGÊNICAS E MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE
HIGIENE EM LINHAS DE ABATE DE BOVINOS E PROCESSAMENTO DA
CARNE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

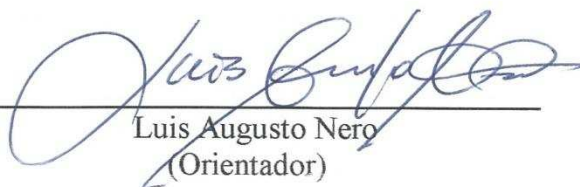
APROVADA: 17 de julho de 2013.



Maria Aparecida Scatamburlo Moreira



Fábio Alessandro Pieri



Luis Augusto Nero
(Orientador)

Dedico esse trabalho ao saudoso amigo Rosalbo Bortoni, por ter me ensinado a seguir meu caminho com dignidade e retidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Cássia e ao meu pai Chico por terem me proporcionado a melhor formação educacional possível ao longo de toda minha vida. Tenho muito orgulho de ter vocês como meus pais.

Agradeço ao meu irmão Vitor por ser um exemplo nos estudos e um parceiro na vida, e por me ajudar a ser um Cruzeiroense fanático.

Ao meu orientador, Luís Augusto Nero, por confiar na minha capacidade e por permitir a realização desse projeto.

Aos meus amigos Marcus (Mococa) e Igor Diniz, por serem o melhor exemplo da palavra amizade.

Aos antigos e atuais moradores da república Pede Cana pela convivência fraternal que tive esses anos.

Aos amigos da VET-05 pelos loucos anos vividos juntos, a base de muitos risos e cervejas. Contem sempre comigo.

Aos amigos do LIPOA pela agradável e imprescindível companhia dentro do laboratório.

Aos amigos do CNSD e Promove Mangabeiras, pelas infundáveis histórias vividas.

Aos amigos cervejeiros, pelas conversas e boas cervejas ingeridas.

OOOEEEEEE!!!!

Ao cavalo Mangalarga Marchador, minha paixão escolhida.

Aos amigos paraquedistas, meus companheiros do céu.

Aos amigos da República Rivotrio, pelos constantes momentos de descontração.

Aos amigos de BH e de Viçosa, sem os quais nada disso faria sentido.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Mercado da Carne	3
2. Processamento e Microbiologia da Carne Bovina	5
3. Micro-organismos indicadores de higiene	10
4. <i>Escherichia coli</i> patogênicas	13
4.1. Mecanismos de patogenicidade de <i>Escherichia coli</i>	19
Referências	23
OBJETIVOS	32
Objetivo geral	32
Objetivos Específicos	32
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: Baixa ocorrência de <i>Escherichia coli</i> patogênicas e contaminação por micro-organismos indicadores de higiene no abate de bovinos e processamento de carne bovina.....	33
Página de título.....	34
Resumo.....	35
1. Introdução.....	36
2. Materiais e Métodos	37
2.1. Frigoríficos e coleta de amostras.....	37
2.2. Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> patogênicas	38
2.3. Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene	40
3. Resultados e Discussão	40
Referências	45

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Principais etapas dos processos de abate de bovinos, inspeção e processamento de carne bovina (adaptado de Gomide et al., 2006). Figuras em cinza indicam instalações, figuras em verde as etapas de inspeção, e figuras em branco as operações. Os asteriscos do lado esquerdo indicam os principais pontos de contaminação microbiológica dos processos.7

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Figura 1. Localização dos pontos de coleta de amostras superficiais em carcaças bovinas (quadrados com linhas pontilhadas) na calha de sangria e após esfolagem (A, representando a carcaça inteira, de ambos os lados), e após evisceração/separação das carcaças e lavagem (B, representando uma meia carcaça, no lado externo e interno).53

Figura 2. Médias de contagens de aeróbios mesófilos (A), enterobactérias (B), coliformes (C), e *Escherichia coli* (D) em carcaças bovinas amostradas em diferentes etapas do abate (I: após sangria, II: após remoção do couro, III) após evisceração e separação de meias carcaças, e IV) após lavagem final). Em cada gráfico, médias acompanhadas de letras distintas são significativamente diferentes ($p < 0.05$).54

Figura 3. Médias de contagens de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e *Escherichia coli* em cortes cárneos embalados obtidos em um frigorífico localizado no estado de Minas Gerais, Brasil.55

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Dados relacionados às exportações de carne bovina brasileira para os sete principais países consumidores desse produto.	4
Tabela 2. Surtos causados por <i>Escherichia coli</i> produtoras de toxina Shiga-like (STEC) entre 2000 e 2011.	15

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Tabela 1. Números de amostras superficiais obtidas em diferentes locais e etapas do abate de bovinos e processamento de carne bovina em três frigoríficos localizados no estado de Minas Gerais, Brasil.	49
Tabela 2. Genes alvo, tamanhos dos produtos de amplificação, primers e suas sequencias utilizados na detecção do potencial patogênico de isolados de <i>Escherichia coli</i> obtidos de carcaças bovinas, ambiente de processamento de carne bovina, e cortes cárneos embalados.	50
Tabela 3. Médias de contagens de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e <i>Escherichia coli</i> em diferentes etapas do abate de bovinos em três frigoríficos localizados no estado de Minas Gerais, Brasil.	51
Tabela 4. Médias de contagens de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e <i>Escherichia coli</i> em utensílios e ambiente de processamento de carne bovina, antes e durante a execução de atividades de manipulação e processamento em um frigorífico localizado no estado de Minas Gerais, Brasil.	52

RESUMO

LANNA, Frederico Germano Piscitelli Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2013. ***Escherichia coli* patogênicas e micro-organismos indicadores de higiene em linhas de abate de bovinos e processamento da carne.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Considerando a importância que a carne bovina representa para a economia do Brasil, estudos que sejam desenvolvidos na cadeia de produção a fim de garantir qualidade e segurança microbiológica desses produtos são fundamentais. A obtenção de produtos cárneos com qualidade e segurança microbiológica pode garantir a posição do Brasil como maior exportador mundial de carne bovina, possibilitando atender aos critérios internacionais, além de assegurar para a população um produto de alta qualidade e seguro. Dentro desse cenário, o presente estudo visou a avaliação da presença de cepas patogênicas de *E. coli* e a contaminação por micro-organismos indicadores de higiene em diferentes etapas da linha de processamento da carne bovina em 3 frigoríficos localizados no estado de Minas Gerais. Foram encontrados dois isolados de *E. coli* com o gene *stx1* e um isolado com o gene *uidA* (O157:H7), em dois frigoríficos diferentes. Em relação as contagens de micro-organismos indicadores de higiene, as contagens médias em carcaças mostram um decréscimo considerável entre as etapas I e II, com significativo aumento na etapa III ($p < 0.05$). Embora as médias de contagens em ambiente e processamento tenham sido baixas, as altas contagens de coliformes e *E. coli* nos produtos cárneos embalados evidenciam falhas ou problemas na manipulação desses produtos.

ABSTRACT

LANNA, Frederico Germano Piscitelli Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2013. **Pathogenic *Escherichia coli* and hygiene indicators microorganisms in bovine slaughter line and meat processing.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Considering the importance that bovine meat represents to Brazil's economy, developed studies in production's chain are fundamental to guarantee the quality and microbiological safety of these products. Obtaining quality and safe meat products can guarantee Brazil as largest exporter of bovine meat, enabling the country to attend the international criteria, beyond ensuring a high quality and safe product for your own population. In this scenario, the present study aimed in the evaluation of the presence of pathogenic *E. coli* and the evaluation of the contamination by hygiene indicators microorganisms of different steps in 3 different bovine slaughter plants located at Minas Gerais state, Brazil. Two isolates of *E.coli* containing de *stx1* gene and one isolate containing the *uidA* gene (O157:H7) were founded at two differents slaughterhouses. In relation to hygiene indicators microorganisms count, mean counts of carcass contamination showed a considerable decrease between steps I e II, with a significative raise in step III ($p < 0.05$). Although the mean counts in the slaughterhouse's environment and processing were low, high counts of coliforms and *E. coli* in packaged meat products showed failures or problems in handling these products.

INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma colação de destaque na produção e comercialização de carne bovina. Atualmente é considerado o segundo maior produtor e o principal país exportador desse produto. Esse status se deve a sua grande extensão territorial e a capacidade de produzir bovinos a baixos custos de produção, através do sistema extensivo de criação, além do desenvolvimento de relações comerciais com antigos e novos parceiros importadores de cortes de carne bovina. A bovinocultura de corte no Brasil é responsável por lucros significativos todos os anos, além de fornecer milhões de empregos diretos e indiretos nos diversos setores envolvidos na cadeia de produção. A consolidação no comércio externo, entretanto, está diretamente ligada a exigências de qualidade e inocuidade, cada vez mais restritas e específicas em acordo com os países importadores. Tais exigências incitam o desenvolvimento de sistemas de controle de qualidade e higiene a serem aplicados em toda a cadeia de produção, a fim de garantir que os produtos finais possuam os critérios exigidos pelos parceiros comerciais, apresentando a qualidade e a inocuidade desejadas.

A forma mais eficiente de garantir que os produtos cárneos sejam produzidos de acordo com padrões internacionais de qualidade e inocuidade é pelo monitoramento constante de parâmetros de qualidade e higiene nas diferentes etapas da produção. Esses sistemas são amplamente utilizados pelas indústrias de alimentos, e baseiam-se na pesquisa sistemática de indicadores biológicos (micro-organismos indicadores de higiene) em pontos específicos da linha de produção de carne bovina. A partir da análise desses indicadores é possível definir medidas corretivas a fim de reduzir ou evitar possíveis contaminações. Os micro-organismos usualmente utilizados para se verificar a higiene dos processos industriais de abate e processamento de bovinos são: aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e *E. coli*.

Além da pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene, a pesquisa direta de microrganismos patogênicos é fundamental para garantir a inocuidade de produtos cárneos. Cepas patogênicas de *Escherichia coli* são frequentemente associadas a carne bovina. Tais cepas são consideradas importantes causadoras de enfermidades associadas a alimentos contaminados, principalmente devido o consumo de produtos cárneos. A presença dessa espécie em carne bovina se dá pela facilidade de contaminação durante o processamento, uma vez que é comensal do trato gastrointestinal dos bovinos, o que permite a contaminação das carcaças e cortes finais por falhas operacionais no abate, como ruptura de alças intestinais, representando assim, um risco significativo para os consumidores.

Assim, estudos que identifiquem a presença de cepas potencialmente patogênicas são fundamentais para garantir a qualidade e segurança microbiológica de produtos cárneos, fornecendo informações importantes sobre a ecologia, epidemiologia e variabilidade genética das cepas patogênicas identificadas ao longo da linha de processamento e nos produtos finais. A partir desses dados é possível se propor medidas de controle e eliminação desses patógenos em pontos específicos da linha de abate e processamento, garantindo dessa forma a qualidade e inocuidade dos produtos cárneos finais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. MERCADO DA CARNE

Desde o início do século XXI a economia brasileira apresenta relevante desenvolvimento, o que permite a expansão de diversos setores para o mercado externo. Nesse contexto, o setor agropecuário brasileiro tem destaque e é responsável por grande parte do volume de produtos exportados. Devido à sua grande extensão territorial e significativa produção agropecuária, o Brasil é considerado o “celeiro do mundo” e ocupa posição de destaque entre os maiores produtores mundiais de produtos agrícolas e de origem animal.

Dentro desse cenário, a bovinocultura de corte é um setor importante da produção agropecuária nacional. Desde o fim da década de 1990, a produção de carne bovina brasileira tem aumentado consideravelmente. Em 2012 a produção brasileira de carne bovina atingiu o recorde de 9,5 milhões de toneladas. Com um consumo médio *per capita* de 40 kg/ano, a maior parte dessa produção é consumida internamente (82%, o que representa 7,7 milhões de toneladas), sendo o restante destinado para a exportação (18% ou 1,69 milhões de toneladas) (ABIEC, 2013; USDA, 2013).

Atualmente o Brasil é responsável por aproximadamente 15% da produção mundial de carne bovina, sendo o segundo maior produtor, superado apenas pelos Estados Unidos, que respondem por aproximadamente 19% da produção mundial. Entretanto, o Brasil é o maior exportador desse produto, com fornecimento para mais de 100 países e com um volume de exportação superior a 7,5 milhões de toneladas por ano. Rússia, Irã, Venezuela, Hong Kong, Itália, Egito, Reino Unido, Holanda, Arábia Saudita e Israel, juntos, são responsáveis por mais de 75% da receita gerada pelas exportações (ABIEC, 2013) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados relacionados às exportações de carne bovina brasileira para os sete principais países consumidores desse produto.

País	Dados*	Carne Bovina				
		Total	In natura	Industrializada	Miúdos	Tripas
Rússia	Renda	1.288.289	1.056.843	185.576	16.201	29.669
	Volume	279.672	253.770	17.949	2.719	5.234
	US\$/ton	6.533	4.165	10.339	5.960	5.668
Egito	Renda	551.270	531.930	13.614	4.753	973
	Volume	139.622	132.963	2.894	3.213	552
	US\$/ton	2.986	4.001	4.704	1.479	1.761
Irã	Renda	320.339	320.339	–	–	–
	Volume	67.018	67.018	–	–	–
	US\$/ton	4.780	4.780	–	–	–
Hong-Kong	Renda	821.300	431.710	184	386.275	3.131
	Volume	221.304	99.419	44	121.278	563
	US\$/ton	4.323	4.342	4.206	3.185	5.558
Itália	Renda	219.646	172.752	37.664	4.260	4.970
	Volume	29.923	23.799	4.153	1.192	779
	US\$/ton	6.570	7.259	9.069	3.574	6.377
Chile	Renda	390.726	376.612	14.114	–	–
	Volume	67.804	65.436	2.368	–	–
	US\$/ton	5.858	5.755	5.960	–	–
Venezuela	Renda	452.385	448.083	111	4.191	–
	Volume	90.390	87.182	18	3.190	–
	US\$/ton	4.230	5.140	6.235	1.314	–
TOTAL	Renda	4.043.955				
	Volume	895.733				
	US\$/ton	5.040				

*Renda: em mil US\$; Volume: em toneladas; US\$/ton: médias

A cadeia da produção de carne bovina gera uma movimentação financeira anual de 167,5 bilhões de dólares e arrecada 16,5 bilhões em impostos agregados, abastecendo cerca de 50 segmentos industriais com matérias-primas. Em reais, os números correspondem a R\$ 328,3 bilhões movimentados em um ano, correspondendo a 7,9% do Produto Interno Bruto (PIB), que atingiu R\$ 4,143 trilhões em 2011, e R\$ 32,3 bilhões em impostos correspondentes. Considerando esse panorama, há uma evidente tendência de contínuo desenvolvimento da bovinocultura de corte no Brasil, com ampliação dos mercados interno e externo (ABIEC, 2013).

Os principais produtos exportados são carnes *in natura* refrigeradas e congeladas

(77% do volume total e 81% da receita gerada em 2010), carnes processadas (10% do volume e da receita), miúdos (7% do volume e 4% da receita) e tripas e carnes salgadas (6% do volume e 5% da receita) (ABIEC, 2013). Considerando os sete principais importadores da carne bovina brasileira (Rússia, Irã, Hong-Kong, Egito, Chile, Venezuela e Itália), podem ser verificadas diferenças relevantes entre os principais produtos adquiridos (Tabela 1).

A situação de destaque mundial na qual o Brasil se encontra em relação a bovinocultura de corte se deve, principalmente, a uma produção de baixo custo devido ao sistema de criação tipicamente extensivo observado nas principais regiões brasileiras produtoras.

2. PROCESSAMENTO E MICROBIOLOGIA DA CARNE BOVINA

O processo de transformação de tecidos musculares de bovinos em carne é um processo complexo, dependente de várias reações enzimáticas que ocorrem a partir do abate do animal. As etapas essenciais para essa transformação são: a interrupção da circulação sanguínea; queda no fornecimento de oxigênio aos músculos e transição de um metabolismo aeróbio para um anaeróbio, com liberação de ácido lático e redução do pH de 7,4 a 5,6; liberação de cálcio intra-celular, com consequente instauração de “*rigor mortis*” e aumento gradual do pH.

O abate industrial de bovinos demanda a atuação direta de funcionários e técnicos habilitados a manipular animais e produtos cárneos nas diferentes etapas do processamento. O processamento da carne segue a seguinte sequência: recepção dos animais e inspeção *ante-mortem*, descanso, jejum e fornecimento de água, atordoamento, pendura pela extremidade distal do membro pélvico, sangria, remoção das extremidades distal dos membros torácicos, esfola da região perianal e dos membros pélvicos, oclusão e liberação do esôfago, remoção completa da pele, liberação e oclusão

do ânus, remoção da cabeça, abertura do esterno e cavidade abdominal evisceração, divisão da carcaça em duas meias carcaças, remoção da medula, toailete, pesagem e avaliação, lavagem com água potável, avaliação final do Serviço de Inspeção, refrigeração em câmara fria (0 a 2 °C) por 24 h para maturação por reações enzimáticas, e finalmente separação em cortes para obtenção de peças destinadas a comercialização (Fernandes, 2009; McEvoy et al., 2004). O fluxograma de todos os processos de abate de bovinos, inspeção e processamento da carne bovina são ilustrados na Figura 1.

Os produtos cárneos são naturalmente susceptíveis a contaminação microbiológica, proveniente dos próprios animais, ambiente de processamento e da manipulação dos funcionários (Gill et al., 1996). Assim, um controle higiênico eficiente deve ser adotado sistematicamente e compatível com a atual realidade da demanda dos consumidores por alimentos com qualidade e segurança.

A pele dos animais é naturalmente contaminada e representa uma importante fonte de contaminação durante o processamento da carne (FSA, 2004; Reid et al., 2002). A contaminação natural da pele dos animais pode ter origem no solo, água, alimentos e/ou fezes e podem incluir patógenos entéricos que representam riscos a saúde humana, como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* (Rivera-Betancourt et al., 2004).

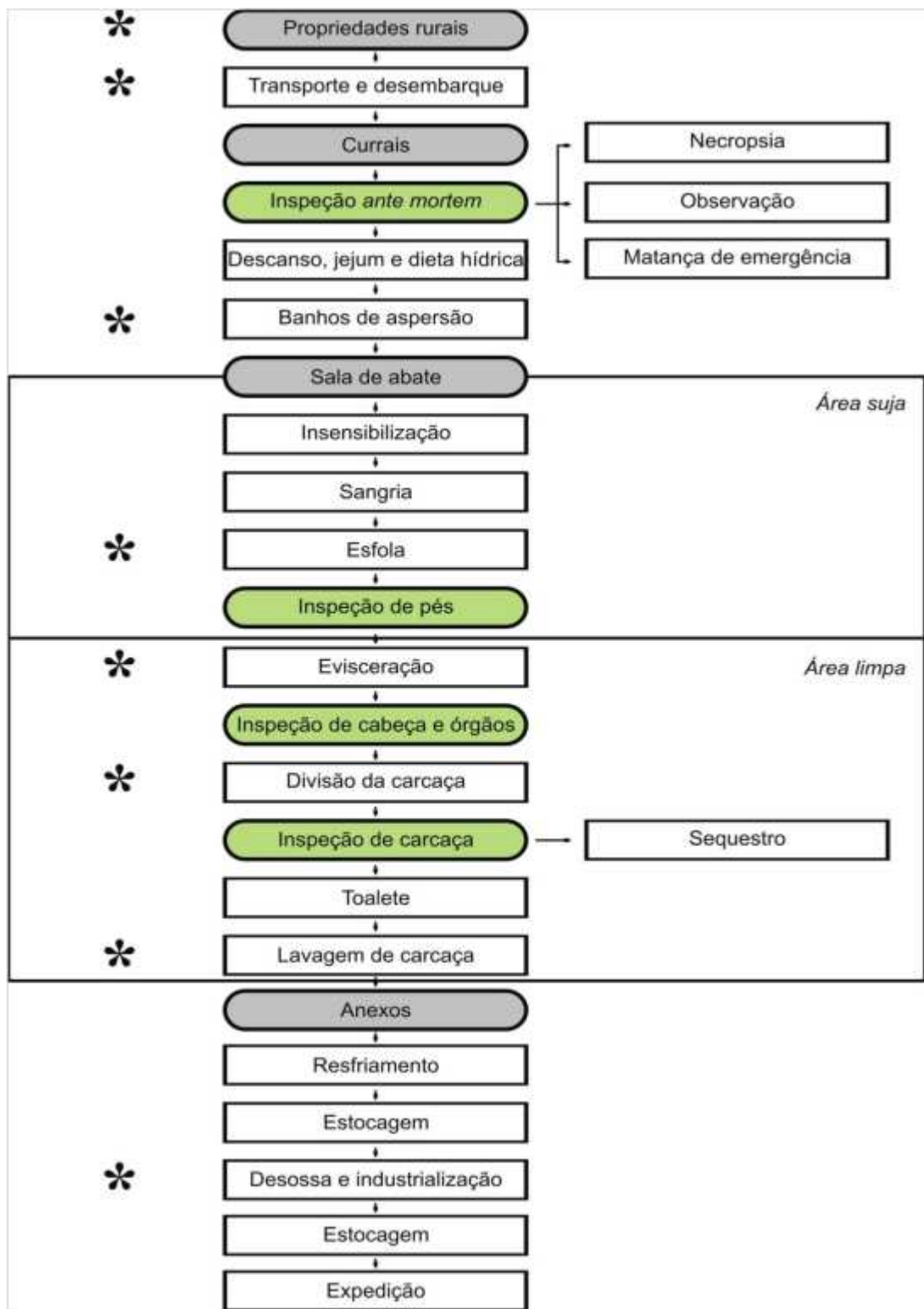


Figura 1. Principais etapas dos processos de abate de bovinos, inspeção e processamento de carne bovina (adaptado de Gomide et al., 2006). Figuras em cinza indicam instalações, figuras em verde as etapas de inspeção, e figuras em branco as operações. Os asteriscos do lado esquerdo indicam os principais pontos de contaminação microbiológica dos processos.

A crescente demanda pela inocuidade e qualidade dos alimentos, acrescida da preocupação com os impactos das doenças nos rebanhos e possíveis riscos à saúde humana, motiva o surgimento e a aplicação de medidas que podem trazer barreiras ao comércio. Desde que o acordo sobre a Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (*SPS – Sanitary and Phytosanitary Measures*) entrou em vigor em 1995, os países importadores têm direito de fazer exigências sanitárias para garantir a segurança e a qualidade dos alimentos. Estas medidas podem, inclusive, ser mais rígidas que os padrões estabelecidos internacionalmente, desde que fique comprovada a plausibilidade científica. Como exemplos de normas que foram publicadas com o objetivo de garantir qualidade e inocuidade de alimentos, a Comissão Europeia instituiu em 2002 a Lei Geral do Alimento (“*General Food Law*”), cujo objetivo é aplicar a análise de risco para a legislação de segurança de alimentos desde a produção até o consumo, e em 2003 o Regulamento CE - 2160/2003, cuja finalidade é controlar os patógenos de origem alimentar na Europa (Fosse et al., 2008).

O modo mais eficiente de se reduzir a contaminação e desenvolvimento microbiano em produtos cárneos é o estabelecimento de programas de controle de qualidade como Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que podem ser conduzidos pela pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene que remetem a práticas adequadas de processamento, além de sugerir a presença de patógenos e micro-organismos causadores de deterioração (Doyle & Beuchat, 2007).

Os sistemas de controle de qualidade utilizados na produção de carne bovina levam em consideração diferentes parâmetros microbiológicos a fim de se verificar a qualidade e inocuidade final dos produtos obtidos. Vários micro-organismos indicadores são utilizados para esse fim, como os aeróbios mesófilos e coliformes. A União Europeia, por exemplo, determina a enumeração de aeróbios mesófilos e

enterobactérias, além de pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças bovinas, como medidas de verificação da qualidade microbiológica do processo de abate (European-Community, 2007). No Brasil, os padrões microbiológicos são seguidos de acordo com o mercado importador, e para o comércio interno os padrões são estabelecidos pela ANVISA, de acordo com a RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001).

As principais origens dos micro-organismos patogênicos e deteriorantes são contaminações cruzadas originadas da pele e vísceras dos animais. A partir de um ponto inicial de contaminação pode ocorrer uma distribuição para áreas limpas, onde os micro-organismos podem se multiplicar e representar novos focos de contaminação. A redução do nível de contaminação microbiológica em um ponto determinado da carcaça bovina pode ocorrer tanto por redistribuição como por remoção (Gill et al., 1996).

Durante o abate, os principais pontos de contaminação de carcaças bovinas são: contaminação cruzada por contato direto nos animais ainda vivos; contato da superfície externa da pele com as massas musculares durante a esfolagem; ruptura de alças intestinais durante a evisceração; manipulação inadequada de carcaças, determinando contaminações por mãos, utensílios ou instalações mal higienizadas (Bolton et al., 2001; Jordan et al., 1999). Segundo Bolton et al. (2001), alguns pontos são considerados críticos para a contaminação microbiológica: a entrada dos animais na linha de abate após o atordoamento; esfolagem (contaminantes presentes na pele); evisceração (contaminantes do conteúdo intestinal); divisão das carcaças em metades e a lavagem final. Cada um destes pontos pode ser considerado como ponto crítico de controle.

É importante enfatizar que, para obtenção de um alimento inócuo, os cuidados devem ter início na fase primária de produção. Dentro deste contexto, sistemas como as BPF e HACCP apresentam-se como alternativas a serem empregadas já na produção primária, pois tem como fundamento a prevenção dos perigos químicos, físicos e biológicos. Nos países desenvolvidos, já há uma mentalidade voltada para sua

adaptação e implantação nas fazendas através de programas do tipo - *from farm to fork*, que numa tradução livre seria a produção de alimentos seguros envolvendo todas as etapas de produção, isto é, da fazenda ao garfo do consumidor (Duffy et al., 2008; Jacob et al., 2010).

3. MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE

O monitoramento sistemático de micro-organismos indicadores de higiene e patógenos garantem informações fundamentais e uteis no controle da contaminação microbiológica de carcaças bovinas. Utilizando como referência os níveis de contaminação microbiológica, podem ser indicados problemas ou falhas no processamento (Gill & Jones, 2000; Gill et al., 1995). Mesmo que esse monitoramento não seja realizado continuamente, atividade que seria a ideal para um controle efetivo da contaminação, uma verificação periódica fornece dados relevantes para avaliar a eficiências de programas de qualidade, como HACCP e BPF.

Carcaças e produtos cárneos são considerados substratos para a multiplicação de micro-organismos. Gradativamente, esgotando-se os carboidratos, inicia-se a utilização de fontes protéicas, que estão presentes em abundância nesses produtos. A partir de contaminações de 7,0 - 8,0 log/cm² a descabroxilação da lisina, ornitina e arginina determina a formação de aminas responsáveis por odores desagradáveis na carne (cadaverina e putrescina). Contaminações superiores a esses valores determinam a formação de limosidade superficial e liberação de H₂S ou NH₃, causando um aspecto repugnante e incompatível com o consumo humano (Doyle & Beuchat, 2007).

De acordo com Buchanan (2000), a pesquisa de micro-organismos em alimentos pode ser dividida em dois tipos: a pesquisa direta de micro-organismos patogênicos e a pesquisa indireta através de indicadores de higiene, que podem sugerir a presença de patógenos. Assim, os principais exemplos são os micro-organismos usualmente

pesquisados no controle de qualidade dos alimentos, como aeróbios mesófilos, coliformes e enterobactérias. Para um controle efetivo dos processos higiênicos de produção, esses grupos de microrganismos são usualmente enumerados nos alimentos, e mesmo em pontos chave do processamento, e comparados com parâmetros de referência que indicam diferentes condições de produção.

Segundo Doyle & Beuchat (2007), para que um micro-organismo seja considerado um bom indicador de higiene, o mesmo deve: ter como hábitat exclusivo o trato intestinal do homem e de outros animais; ocorrer em números muito altos nas fezes; apresentar alta resistência ao ambiente extra-enteral; possuir técnicas rápidas, simples e precisas para sua detecção e/ou contagem. Como exemplos de micro-organismos indicadores podem ser citados aqueles que, segundo a ICMSF, podem ser agrupados em:

1. Micro-organismos que não oferecem risco direto à saúde: contagem padrão de mesófilos, contagem de psicrótróficos e termófilos, contagem de bolores e leveduras;
2. Micro-organismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C, enterococos, enterobactérias totais e *Escherichia coli*;

O grupo dos aeróbios mesófilos é composto por micro-organismos da família Enterobacteriaceae, além de representantes dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* e *Streptococcus*, dentre outros. Embora seja considerada uma relação entre a alta contagem de mesófilos e a possível presença de patógenos, uma vez que todos os patógenos são mesófilos, alguns estudos tem demonstrado que essa associação não é totalmente verdadeira (Crowley et al., 2005). Entretanto, a pesquisa de mesófilos em alimentos possui relevância por indicar condições genéricas inadequadas de produção, conservação ou mesmo transporte (Serraino et al., 2012). De maneira geral,

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

As enterobactérias compreendem um grupo de micro-organismos classicamente utilizados na determinação de contaminações causadas por fezes, por serem encontradas no intestino, mas também são encontradas em regiões extra-intestinais. São bacilos Gram negativos e estão amplamente distribuídos no solo, água, plantas e intestinos do homem e dos animais. Atualmente, alguns laboratórios preferem enumerar enterobactérias ao invés de coliformes e *E. coli*, por considerarem as bactérias do grupo coliforme mal distribuídas taxonomicamente, pela possibilidade de ocorrência de resultados falso positivos pela identificação apenas de grupos fermentadores de lactose, e pela maior resistência das cepas de *Salmonella* em detrimento à *E. coli* e outros coliformes (Doyle & Beuchat, 2007).

Os coliformes fazem parte da família Enterobacteriaceae e têm várias características em comum com espécies do gênero *Salmonella* e *Shigella*, as quais todas são patogênicas. Entretanto, a principal diferença bioquímica característica é que os coliformes fermentam a lactose com a produção de ácido e gás, enquanto *Salmonella* e *Shigella* não (Doyle & Beuchat, 2007). São bacilos Gram negativos e não formadores de esporos. Além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal como *Salmonella* e *Shigella*. Consequentemente, segundo Doyle & Beuchat (2007), a presença de coliformes a 35°C no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos.

A definição de coliformes a 45 °C é a mesma dos coliformes a 35 °C, com a diferença de que os primeiros são capazes de fermentar lactose e produzir ácido e gás quando incubados a 44°- 45,5°C por 24-48 h. Nessas condições, ao redor de 90% das culturas de *E. coli* são positivas, enquanto que entre os demais gêneros, apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm essa característica (Doyle & Beuchat, 2007). São indicadores sanitários por indicarem uma possível presença de micro-organismos patogênicos e também devido à existência de sorotipos patogênicos de *Escherichia coli*. A pesquisa de coliformes a 45 °C ou de *E. coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (Doyle & Beuchat, 2007).

4. ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICAS

Escherichia coli, membro da família Enterobacteriaceae, compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporogênicos, produtores de catalase, mas não de oxidase, que podem apresentar motilidade por meio de flagelos peritríquios. Possuem de 1,1 a 1,5 µm x 2,0 a 6,0 µm, ocorrendo em pares ou isoladamente e sua temperatura ideal de multiplicação é de 37° C. Este micro-organismo é considerado um dos patógenos bacterianos mais versáteis: enquanto algumas cepas são membros da microbiota de homens e animais, desempenhando um importante papel na fisiologia intestinal, outras possuem fatores de virulência que as capacitam a causar infecções no trato intestinal ou em outros locais, como no trato urinário e até mesmo meningite (Doyle & Beuchat, 2007).

Por ser predominante na microbiota intestinal, *E. coli* é considerada, até o momento, o melhor indicador de contaminação de origem fecal em alimentos. Além de estar relacionada a práticas de higiene insatisfatórias, sua importância em alimentos é ainda mais evidente devido a presença de cepas patogênicas para o homem, que

estiveram envolvidas em surtos de doenças associadas ao consumo de alimentos contaminados (Doyle & Beuchat, 2007).

Os sorotipos desta bactéria são definidos com base nos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K) e são designados por números arábicos, colocados em seguida a cada letra representativa do antígeno, como por exemplo: O26:K60:H11. Atualmente, são reconhecidos 179 Ag O, 53 Ag H e 103 Ag K. No entanto, nem todo isolado de *E. coli* expressa os três antígenos ao mesmo tempo, pois uma parte pode ser rugosa, não possuindo o Ag O, e outra imóvel, não possuindo flagelos. Em consequência, a identificação sorológica de *E. coli* é muitas vezes incompleta, podendo se basear, nesses casos, apenas nos antígenos O ou H (Doyle & Beuchat, 2007).

A patogenicidade de *E. coli* é um mecanismo multifatorial complexo, que envolve um grande número de fatores de virulência, como toxinas e adesinas, codificados por genes localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, bacteriófagos e ilhas genômicas. Dessa maneira, esses genes podem ser transmitidos entre as cepas resultando em novas combinações de genes de virulência ou tornando uma *E. coli* não patogênica em patogênica (Kaper et al., 2004).

De acordo com os fatores de virulência e seus mecanismos de ação, tipo de manifestação clínica e epidemiologia, os subgrupos de *E. coli* considerados diarreiogênicos (EHEC) ou uropatogênicos (UPEC), atualmente, agrupados em seis patotipos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* de adesão difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) (Sahl et al., 2013). Entre esses grupos, pode ser considerado de maior importância na área de alimentos, o grupo das STEC, tendo em vista os inúmeros surtos causados, com diversos óbitos, como demonstra a Tabela 2.

Tabela 2. Surtos causados por *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga-like (STEC) entre 2000 e 2011.

Ano	Localização	Nº de casos (mortes)	Casos de SHU	Veículo	Referência
2000	Inglaterra	4		leite não pasteurizado	Eurosurveillance, 2010
2003/2004	Dinamarca	25		leite	Eurosurveillance, 2010
2005	Holanda	21		produtos cárneos	Eurosurveillance, 2010
2005	Irlanda	18		interpessoal	Eurosurveillance, 2010
2006	EUA	199 (3)	31	espinafre	CDC, 2010
2006	EUA	71	8	alface	CDC, 2010
2007	Holanda/Islândia	50		alface	Eurosurveillance, 2010
2007	EUA	21	4	pizza congelada	CDC, 2010
2007	EUA	40	2	carne de hambúrguer	CDC, 2010
2007	Dinamarca	20		salsicha	Eurosurveillance, 2010
2008	EUA	49	1	carne moída	CDC, 2010
2008/2009	Holanda	20		produtos cárneos	Eurosurveillance, 2010
2009	EUA	23	2	carne moída	CDC, 2010
2009	EUA	72	10	massa de biscoito	CDC, 2010
2009	EUA	26 (2)	5	carne moída	CDC, 2010
2010	EUA	3	1	leite não pasteurizado	ProMED, 2010
2010	EUA	26	3	alface	ProMED, 2010
2011	Alemanha	3816 (54)	852	semente de feno grego	Soon, Seaman et al. 2013

Cepas de STEC compreendem todos os isolados de *E. coli* capazes de produzir toxinas citotóxicas semelhantes às sintetizadas por *Shigella dysenteriae*. Pelo fato de causarem efeito citopático em culturas de células Vero, STEC também eram denominadas como VTEC, ou seja, *E. coli* produtora de verotoxina (Karmali, 1989). STEC são considerados patógenos de origem alimentar, responsáveis por um amplo espectro de doenças humanas que varia de diarreias brandas até severas e sanguinolentas, a complicações graves como colite hemorrágica (CH), síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombótica trombocitopênica (PTT) (Kaper et al., 2004). Os ruminantes, em especial os bovinos e ovinos, são seus principais reservatórios. Sendo assim, a contaminação fecal dos alimentos representa a fonte habitual de infecção para humanos. A transmissão pessoa-pessoa também tem sido

observada em surtos, visto que a dose infecciosa é aparentemente baixa (Paton & Paton, 1998).

Desde 1982, quando o sorotipo O157:H7 foi pela primeira vez associado a enfermidades associados a consumo de alimentos contaminados, através de um surto ocorrido nos Estados Unidos (Riley et al., 1983), mais de 100 surtos foram documentados com 52 % tendo sido atribuídos ou relacionados a alimentos derivados de carne (Woerner et al., 2006). Embora o sorogrupo O157 seja atualmente o mais estudado, há mais de 100 sorogrupos de STEC implicados em doenças humanas, destacando-se os sorogrupos O26, O103, O111 e O145 que estão sendo cada vez mais isolados de surtos e casos clínicos (Perelle et al., 2007). Em alguns países, esses sorogrupos são mais frequentemente isolados de pacientes com diarreia e SHU do que cepas O157 (Brooks et al., 2005; Caprioli et al., 1994; De Toni et al., 2009; Guth et al., 2005; Huppertz et al., 1996; Rivas et al., 2006; Souza et al., 2007; Vaz et al., 2004).

STEC é considerada um sério problema de saúde em muitos países desenvolvidos, entre eles Estados Unidos, Canadá, Japão e Reino Unido. Nos Estado Unidos, o sorotipo O157:H7 é a principal causa de CH e SHU em crianças (Echeverry et al., 2006). Entre os surtos ocasionados por STEC, o maior já relatado ocorreu no Japão em 1996, envolvendo mais de 10.000 casos (CDC, 2013). Sorogrupos não-O157 são mais comuns na Europa, Austrália e América Latina, incluindo o Brasil (Guth, 2008).

No Brasil, Irino et al. (2007) relataram, pela primeira vez, a associação entre o sorotipo O157:H7 e doença em humanos ao analisarem cepas provenientes de três pacientes com diarreia severa à sanguinolenta no estado de São Paulo. Nesse mesmo ano, Guth et al. (2002) relataram o primeiro caso de SHU causado por STEC em um paciente de oito meses na região Nordeste do país, e o sorotipo identificado foi o O26:H11. No entanto, as infecções humanas por STEC no Brasil são principalmente associadas a casos de diarreia não sanguinolenta, especialmente em crianças (Guth et

al., 2005; Irino et al., 2007; Vaz et al., 2004). Vaz et al. (2004) e Cergole-Novella et al. (2006) relataram que a maioria das cepas de STEC isoladas de humanos pertenciam ao sorogrupo O111 e estavam relacionadas com casos de diarreia sem demais complicações.

Durante o abate, a contaminação por cepas patogênicas de *E. coli* pode ocorrer principalmente quando o couro é removido da carcaça do animal (esfola), ou quando a carcaça entra em contato com o conteúdo intestinal durante a evisceração (Penney et al., 2007). Uma vez na superfície da carcaça, o patógeno pode ser disseminado pelo manuseio dos operadores. O subsequente abuso de temperatura na linha de produção ou na cadeia de varejo contribui para a multiplicação do patógeno. A contaminação da carne representa um risco significativo durante as diversas etapas do processamento, podendo chegar aos produtos finais, colocando em risco a saúde dos consumidores (Carney et al., 2006).

Foi demonstrado também que a contaminação secundária de alimentos com O157:H7 e outras cepas STEC pode ocorrer em etapas subsequentes ao abate do animal. STEC pode ser introduzida em produtos cozidos ou que não recebem tratamento térmico prévio através de contaminação cruzada pelo contato com carnes cruas, mãos, utensílios ou superfícies durante o preparo desses alimentos (Cagney et al., 2004; Mainil & Daube, 2005).

Rajpura et al. (2003) reportaram surtos de doenças por STEC O157 onde a causa mais provável foi a contaminação cruzada entre carnes cruas e cozidas ocorridas em lojas tipo “delicatessen” de supermercados do Reino Unido. Os utensílios ou superfícies também são fatores fundamentais na contaminação cruzada dos alimentos. O estudo realizado por Warriner et al. (2002) demonstrou que o mesmo clone de *E. coli* foi isolado de uma carcaça de suíno e de um equipamento usado no processamento da carne obtida.

Vários trabalhos relatam a presença de STEC em produtos cárneos. Carney et al. (2006) observaram uma frequência de 2,4% de STEC em cortes bovinos, com a maioria dos isolados apresentando importantes genes associados à patogenicidade. Chapman (1995) verificaram a presença de *E. coli* O157 em um estudo desenvolvido ao longo de um ano na Inglaterra, e isolaram o patógeno em 12,9% dos bovinos, 1,4% das carcaças e em 0,44% dos produtos cárneos, com maiores frequências e contagens acima de 10⁴ UFC/g entre os meses de julho e agosto. Madden et al. (2001), em estudo realizado na Irlanda do Norte, não isolaram *E. coli* O157:H7 em nenhuma das carcaças bovinas analisadas. Fantelli & Stephan (2001) detectaram a presença de cepas de *E. coli* em 2,3% de amostras de carne picada na Suíça, que apresentavam os genes *stx1* e *stx2*. Tutenel et al. (2003) detectaram *E. coli* O157 em carcaças bovinas e em amostras de carne moída, apresentando vários genes associados à patogenicidade. Em estudo realizado no Brasil e Argentina (Guth et al., 2003), a maioria dos isolados patogênicos de *E. coli* apresentaram o gene *stx2*, com diferenças no potencial patogênico considerando os sorotipos e genótipos.

No Brasil, os dados sobre a ocorrência de STEC em carnes bovinas comercializadas são bastante limitados. Bergamini et al. (2007) detectaram STEC em 4 (3,5%) das 114 amostras de carne moída crua coletadas em Ribeirão Preto. Porém, não detectaram o micro-organismo nas 136 amostras de carne moída adquiridas em Campinas, São Paulo. Resultado semelhante foi obtido por Silveira *et al.* (1999), que não detectaram *E. coli* O157:H7 em 886 amostras de hambúrgueres provenientes de oito diferentes produtores da região sul do Brasil, no período de janeiro a setembro de 1997. Silva et al. (2001), analisaram 340 amostras de produtos cárneos, não sendo detectada a presença de *E. coli* O157:H7 em nenhuma das amostras analisadas. Esses resultados, segundo os autores, complementam outros já previamente relatados para produtos

cárneos no Brasil, atestando, senão a ausência, pelo menos uma baixa frequência do patógeno em nossa produção.

Em revisão sobre gestão quantitativa dos riscos inerentes à presença de *E. coli* O157: H7 em carne bovina, Duffy et al. (2008) concluíram que todos os experimentos com modelagens para previsão da incidência de *E. coli* O157:H7 podem sofrer variações em suas previsões da enfermidade, influenciadas pelas diferentes concentrações e prevalência de *E. coli* em regiões geográficas diversas. Ressaltaram ainda que qualquer um dos modelos poderia ser adaptado e executado com a adaptação dos dados de entrada / práticas de outros países ou regiões para avaliar e gerir os riscos apresentados por *E. coli* O157: H7 na carne.

O estudo de Duffy et al. (2008) relatou ainda que apesar das previsões de risco serem diferentes, houve uma acentuada similaridade de todos os modelos em termos de fatores de maior impacto de risco. Quatro dos cinco modelos demonstraram que o fator com maior impacto sobre a doença foi a concentração do patógeno nas fezes ou pele dos animais no abate. Por isso, consideraram provável que os esforços destinados a eliminar os animais portadores em níveis muito elevados do patógeno na entrada da cadeia produtiva da carne renderiam bom retorno em termos de redução de risco. De forma similar, o abuso de temperatura no varejo também apresentou alta incidência nos fatores de risco dos modelos.

4.1. Mecanismos de patogenicidade de *Escherichia coli*

EHEC causa diarreia pela sua capacidade de aderir à membrana da célula do hospedeiro e colonizar o intestino grosso, produzindo uma ou mais toxinas (Chapman, 1995). Apesar disso, alguns fatores de virulência são bem conhecidos e caracterizados, como a toxina de Shiga 1 e 2, a intimina e a enterohemolisina (Nataro & Kaper, 1998).

Cepas de STEC produzem uma ou duas citotoxinas denominadas toxina de Shiga tipo 1 (Stx1) e tipo 2 (Stx2), das quais Stx2 é fator de virulência primário para SHU

(Tzipori et al., 2004). Porém, cabe ressaltar que apesar da importância das Stx para a patogenicidade de STEC, nem todas as cepas produtoras destas toxinas são capazes de causar doenças, pois a patogenicidade é multifatorial (Coombes et al., 2008; Tarawneh et al., 2009). Essas citotoxinas foram primeiramente descritas como verotoxinas (VTs) por Konowalchuk et al. (1977), uma vez que causam efeito citopático irreversível em culturas de células Vero, originárias de rim de macaco verde africano. Também são denominadas de toxinas “Shiga-like” (SLTs), já que são semelhantes à toxina produzida pelo bacilo de Shiga (*Shigella dysenteriae* tipo 1), causador da disenteria bacilar. São proteínas de alto peso molecular e sua produção é determinada por dois fagos lisogênicos distintos (Doyle & Beuchat, 2007).

A toxina de Shiga é composta por uma subunidade A, que é a parte biologicamente ativa, e cinco subunidades B, que se ligam aos receptores celulares específicos (Karmali et al., 2010). O modo geral de ação dessas toxinas envolve a adesão a um receptor glicolipídico na superfície da célula através das subunidades B e a internalização da subunidade A, que é enzimaticamente reduzida a um fragmento A1, responsável por remover um grupo adenina do RNA 28S, pertencente à fração 60S dos ribossomos dos enterócitos. Isto resulta na inibição da síntese protéica e interrupção do funcionamento celular, ocasionando a apoptose da célula. A especificidade de Stx nas células-alvo depende da quantidade de receptores específicos presentes na membrana destas células. O receptor Gb3 (globotriaosilceramida), específico para Stx1 e Stx2, está presente nas células Vero e HeLa, tornando-as susceptíveis à atividade citotóxica de Stx (Karmali et al., 2010).

Em humanos, após a colonização do intestino por células de STEC, as Stx são produzidas e atravessam a parede intestinal através de internalização pelas células do hospedeiro, atingindo a corrente sanguínea. Na circulação, o principal alvo são as células endoteliais de artérias de pequeno porte, dos rins, cérebro e mucosa

gastrointestinal. As consequências são o extravasamento de fluídos e/ou hemorragias levando a lesões de tecido e síndromes clínicas (Mainil & Daube, 2005; Pruimboom-Brees et al., 2000).

No rim, essas toxinas causam dano renal crônico, levando à diálise e eventual necessidade de transplante em casos de SHU. A nefrotoxicidade é observada em 10% dos pacientes com infecção por STEC. Doenças neurológicas também podem ocorrer após a infecção ou como parte de sequelas causadas pela PTT, levando ao desenvolvimento de coágulos e conseqüentemente à morte do paciente (Kaper et al., 2004).

Stx1 é antígenicamente mais parecida à toxina produzida por *S. dysenteriae* sorotipo 1, e constitui um grupo mais homogêneo, com apenas duas variantes: Stx1c e Stx1d, que se diferem ligeiramente em sua sequência de aminoácidos, sem consequências sobre sua antigenicidade e toxicidade celular. Por outro lado, Stx2 apresenta cinco variantes (Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g) que diferem muito entre si em sua antigenicidade, toxicidade e sequências genéticas (Caprioli et al., 1994; Guth, 2008). Estudos têm demonstrado uma maior patogenicidade de Stx2 em relação a Stx1, uma vez que há uma forte associação entre a presença de Stx2 e o desenvolvimento de SHU (Karmali et al., 2010).

Outro fator de virulência, a lesão A/E, “attaching and effacing” ou adesão íntima e destruição das microvilosidades, é uma lesão histológica específica do intestino causada por uma classe de cepas patogênicas, denominadas EPEC (Karmali, 1989). Posteriormente, foi observado que cepas EHEC O157:H7 podem produzir uma lesão muito semelhante, estendendo a definição de EHEC para todas as cepas de *E. coli* produtoras de Stx e lesões A/E (Mainil & Daube, 2005). Este tipo de lesão interrompe a função das células epiteliais e induz a uma lesão característica das microvilosidades. A produção da lesão A/E é resultado de uma interação específica e bem regulada entre a

bactéria e a célula eucariótica. Esse evento ocorre em três etapas: aderência inicial, transdução do sinal e aderência íntima (Nataro & Kaper, 1998).

A primeira etapa consiste na adesão da bactéria à superfície das microvilosidades da célula hospedeira. Essa aderência provoca a expressão de vários genes localizados em uma ilha de patogenicidade no cromossomo, denominado “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE). Na segunda etapa, ocorre transdução de sinais para a célula eucariótica por meio de um sistema de secreção do tipo III, que também está localizado na LEE. Através da fosforilação de várias proteínas da célula eucariótica, o sistema de secreção do tipo III causa alterações no citoesqueleto das células da mucosa intestinal, com destruição das microvilosidades e acúmulo de actina no local da adesão. Na terceira etapa, ocorre a adesão íntima da bactéria à membrana citoplasmática do enterócito, levando à amplificação das alterações no citoesqueleto. Essa adesão é mediada pela intimina, uma proteína codificada pelo gene *eae*, localizado na ilha de patogenicidade LEE (Karmali et al., 2010; Nataro & Kaper, 1998). Um terceiro fator é a enterohemolisina (Ehx), codificada pelo gene denominado de *ehxA* e que está contido no plasmídeo de virulência pO157, de aproximadamente 60 MDa. O gene estrutural *ehxA* possui 60% de homologia com o gene da α -hemolisina (*hlyA*), codificado pelo gene α -*hly* (Feng & Monday, 2000). A enterohemolisina é uma proteína de 110 kDa que se insere na membrana citoplasmática de células eucarióticas formando poros e levando à destruição destas células (Mainil & Daube, 2005).

Na atividade “in vivo”, apesar de haver uma forte associação entre a produção de Ehx e de Stx com o desenvolvimento de SHU e CH em humanos, a real contribuição de Ehx na patogênese de STEC permanece desconhecida (Saitoh et al., 2008). Porém, há relatos sugerindo que sua presença possa potencializar os efeitos causados pelas Stx, uma vez que a hemoglobina liberada pela ação da Ehx nos eritrócitos serve de estímulo

para a multiplicação de cepas STEC no intestino (Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998).

REFERÊNCIAS

- ABIEC, 2013. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes - Estatísticas.
- Bergamini, A.M.M., Simões, M., Irino, K., Gomes, T.A.T., & Guth, B.E.C., 2007. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:553-556.
- Bolton, D.J., Doherty, A.M., & Sheridan, J.J., 2001. Beef HACCP: intervention and non-intervention systems. *International Journal of Food Microbiology* 66:119-129.
- Brasil, 2001. Resolução-RDC 12 de 2 de janeiro: Regulamento técnico sobre os Padrões microbiológicos para alimentos, p. 45, Diário Oficial da União de 10/01/2001.
- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M., & Strockbine, N.A., 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *Journal of Infectious Diseases* 192:1422-1429.
- Buchanan, R.L., 2000. Acquisition of microbiological data to enhance food safety. *Journal of Food Protection* 63:832-838.
- Cagney, C., Crowley, H., Duffy, G., Sheridan, J.J., O'Brien, S., Carney, E., Anderson, W., McDowell, D.A., Blair, I.S., & Bishop, R.H., 2004. Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland. *Food Microbiology* 21:203-212.

- Caprioli, A., Luzzi, I., Rosmini, F., Resti, C., Edefonti, A., Perfumo, F., Farina, C., Goglio, A., Gianviti, A., & Rizzoni, G., 1994. Communitywide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 169:208-211.
- Carney, E., O'Brien, S.B., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S., & Duffy, G., 2006. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food Microbiology* 23:52-59.
- CDC, 2013. Center for Disease Control and Prevention.
- Cergole-Novella, M.C., Nishimura, L.S., Irino, K., Vaz, T.M.I., De Castro, A.F.P., Leomil, L., & Guth, B.E.C., 2006. Stx genotypes and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and foods in Brazil. *FEMS Microbiology Letters* 259:234-239.
- Chapman, P.A., 1995. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: an overview with emphasis on the epidemiology and prospects for control of *E. coli* O157. *Food Control* 6:187-193.
- Coombes, B.K., Wickham, M.E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B.B., & Karmali, M.A., 2008. Molecular analysis as an aid to assess the Public Health risk of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2153-2160.
- Crowley, H., Cagney, C., Sheridan, J.J., Anderson, W., McDowell, D.A., Blair, I.S., Bishop, R.H., & Duffy, G., 2005. Enterobacteriaceae in beef products from retail outlets in the Republic of Ireland and comparison of the presence and counts of *E. coli* O157:H7 in these products. *Food Microbiology* 22:409-414.
- De Toni, F., De Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Klassen, G., Irino, K., Un Rigo, L., Steffens, M.B.R., Fialho, O.B., Farah, S.M.S.S., & Fadel-Picheth, C.M.T., 2009. A

- prospective study on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Paraná State, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 48:645-647.
- Doyle, M.P. & Beuchat, L.R., 2007. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, New York.
- Duffy, G., Lynch, O.A., & Cagney, C., 2008. Tracking emerging zoonotic pathogens from farm to fork. *Meat Sci* 78:34-42.
- Echeverry, A., Loneragan, G.H., & Brashears, M.M., 2006. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces over time under various temperature conditions. *Journal of Food Protection* 69:2851-2855.
- European-Community, 2007. Regulation 1441 of 5th of December, modifies Reg EC 2005/2073 on microbiological criteria for foodstuffs, p. 12-29, Official Journal of the European Union.
- Fantelli, K. & Stephan, R., 2001. Prevalence and characteristics of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology* 70:63-69.
- Feng, P. & Monday, S.R., 2000. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Molecular and Cellular Probes* 14:333-337.
- Fernandes, R., 2009. *Microbiology handbook: Meat Products*. Leatherhead.
- Fosse, J., Seegers, H., & Magras, C., 2008. Foodborne zoonoses due to meat: a quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe. *Veterinary Research* 39:16.
- FSA, 2004. Clean Beef Cattle for slaughter. A guide for producers. Food Standard Agency, London.

- Gill, C.O., 1998. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs, p. 118-157. In: Davies, A. & Board, R. (Eds.), *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic and Professional, London.
- Gill, C.O. & Jones, T., 2000. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *Journal of Food Protection* 63:167-173.
- Gill, C.O., McGinnis, D.S., Bryant, J., & Chabot, B., 1995. Decontamination of commercial, polished pig carcasses with hot water. *Food Microbiology* 12:143-149.
- Gill, C.O., McGinnis, J.C., & Badoni, M., 1996. Use of total or *Escherichia coli* counts to assess the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. *International Journal of Food Microbiology* 31:181-196.
- Guth, B.E.C., 2008. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), p. 271-309. In: Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (Eds.), *Microbiologia*. Atheneu, São Paulo.
- Guth, B.E.C., Chinen, I., Miliwebsky, E., Cerqueira, A.M.F., Chillemi, G., Andrade, J.R.C., Baschkier, A., & Rivas, M., 2003. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. *Veterinary Microbiology* 92:335-349.
- Guth, B.E.C., Souza, R.L., Vaz, T.M.I., & Irino, K., 2002. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. *Emerging Infectious Disease* 5:535-536.
- Guth, B.E.C., Vaz, T.M.I., Gomes, T.A.T., Chinarelli, S.H., Rocha, M.M.M., Castro, A.F.P., & Irino, K., 2005. Re-emergence of O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 54:805-806.

- Huppertz, H.-I., Busch, D., Schmidt, H., Aleksic, S., & Karch, H., 1996. Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. *The Journal of Pediatrics* 128:341-346.
- Irino, K., Vaz, T.M.I., Medeiros, M.I.C., Kato, M.A.M.F., Gomes, T.A.T., Vieira, M.A.M., & Guth, B.E.C., 2007. Serotype diversity as a drawback in the surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 56:565-567.
- Jacob, C., Mathiasen, L., & Powell, D., 2010. Designing effective messages for microbial food safety hazards. *Food Control* 21:1-6.
- Jordan, D., McEwen, S.A., Lammerding, A.M., McNab, W.B., & Wilson, J.B., 1999. A simulation model for studying the role of pre-slaughter factors on the exposure of beef carcasses to human microbial hazards. *Preventive Veterinary Medicine* 41:37-54.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., & Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews of Microbiology* 2:123-140.
- Karmali, M.A., 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2:15-38.
- Karmali, M.A., Gannon, V., & Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology* 140:360-370.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I., & Stavric, S., 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 18:775-779.
- Madden, R.H., Espie, W.E., Moran, L., McBride, J., & Scates, P., 2001. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in Northern Ireland. *Meat Science* 58:343-346.

- Mainil, J.G. & Daube, G., 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology* 98:1332-1344.
- McEvoy, J.M., Sheridan, J.J., Blair, I.S., & McDowell, D.A., 2004. Microbial contamination on beef in relation to hygiene assessment based on criteria used in EU Decision 2001/471/EC. *International Journal of Food Microbiology* 92:217-225.
- Nataro, J.P. & Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11:142-201.
- Paton, A.W. & Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb* O111, and *rfb* O157. *Journal of Clinical Microbiology* 36:598-602.
- Penney, N., Bigwood, T., Barea, H., Pulford, D., LeRoux, G., Cook, R., Jarvis, G., & Brightwell, G., 2007. Efficacy of a peroxyacetic acid formulation as an antimicrobial intervention to reduce levels of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 on external carcass surfaces of hot-boned beef and veal. *Journal of Food Protection* 70:200-203.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., & Fach, P., 2007. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *International Journal of Food Microbiology* 113:284-288.
- Pruimboom-Brees, I.M., Morgan, T.W., Ackermann, M.R., Nystrom, E.D., Samuel, J.E., Cornick, N.A., & Moon, H.W., 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:10325-10329.
- Rajpura, A., Lamden, K., Forster, S., Clarke, S., Cheesbrough, J., Gornall, S., & Waterworth, S., 2003. Large outbreak of infection with *Escherichia coli* O157

- PT21/28 in Eccleston, Lancashire, due to cross contamination at a butcher's counter. *Communicable Disease and Public Health* 6:279-284.
- Reid, C.A., Small, A., Avery, S.M., & Buncic, S., 2002. Presence of food-borne pathogens on cattle hides. *Food Control* 13:411-415.
- 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., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine* 308:681-685.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, i., Roldán, C.D., Balbi, L., García, B., Fiorilli, G., Sosa-Estani, S., Kincaid, J., Rangel, J., & Griffin, P.M., 2006. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease* 3:88-96.
- Rivera-Betancourt, M., Shackelford, S.D., Arthur, T.M., Westmoreland, K.E., Bellinger, G., Rossman, M., Reagan, J.O., & Koochmaraie, M., 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection* 67:295-302.
- Sahl, J.W., Morris, C.R., & Rasko, D.A., 2013. Chapter 2 - Comparative genomics of pathogenic *Escherichia coli*, p. 21-43. In: Michael, D. (Ed.), *Escherichia coli* (Second Edition). Academic Press, Boston.
- Saitoh, T., Iyoda, S., Yamamoto, S., Lu, Y., Shimuta, K., Ohnishi, M., Terajima, J., & Watanabe, H., 2008. Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte

- effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190:4822-4830.
- Serraino, A., Bardasi, L., Riu, R., Pizzamiglio, V., Liuzzo, G., Galletti, G., Giacometti, F., & Meriardi, G., 2012. Visual evaluation of cattle cleanliness and correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. *Meat Science* 90:502-506.
- Silva, N., Silveira, N.F.A., Contreras, C., Beraquet, N.J., Yokoya, F., Nascimento, C.A., Oliveira, V.M., & Tse, C.L., 2001. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 21:223-227.
- Souza, R.L., Nishimura, L.S., & Guth, B.E.C., 2007. Uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O165:HNM as cause of hemolytic uremic syndrome in São Paulo, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59:223-225.
- Tarawneh, K.A., Al-Tawarah, N.M., Abdel-Ghani, A.H., Al-Majali, A.M., & Khleifat, K.M., 2009. Characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) isolates from faeces of small ruminants and environmental samples in southern Jordan. *Journal of Basic Microbiology* 49:310-317.
- Tutenel, A.V., Pierard, D., Van Hoof, J., Cornelis, M., & De Zutter, L., 2003. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter. *International Journal of Food Microbiology* 84:63-69.
- Tzipori, S., Sheoran, A., Akiyoshi, D., Donohue-Rolfe, A., & Trachtman, H., 2004. Antibody therapy in the management of Shiga Toxin-Induced hemolytic uremic syndrome. *Clinical Microbiology Reviews* 17:926-941.
- USDA, 2013. U. S. Department of Agriculture - Agency Reports.
- Vaz, T.M.I., Irino, K., Kato, M.A.M.F., Dias, Â.M.G., Gomes, T.A.T., Medeiros, M.I.C., Rocha, M.M.M., & Guth, B.E.C., 2004. Virulence properties and

characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology* 42:903-905.

Warriner, K., Aldsworth, T.G., Kaur, S., & Dodd, C.E.R., 2002. Cross-contamination of carcasses and equipment during pork processing. *Journal of Applied Microbiology* 93:169-177.

Woerner, D.R., Ransom, J.R., Sofos, J.N., Dewell, G.A., Smith, G.C., Salman, M.D., & Belk, K.E., 2006. Determining the prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle and beef from the feedlot to the cooler. *Journal of Food Protection* 69:2824-2827.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a contaminação por micro-organismos indicadores de higiene e *Escherichia coli* patogênicas em carcaças bovinas durante o abate, ambiente de processamento de carne bovina, e cortes cárneos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Quantificar a contaminação por aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e *Escherichia coli* em carcaças bovinas em diferentes etapas do abate, em utensílios e equipamentos utilizados no processamento da carne bovina, e em cortes cárneos obtidos ao final do processamento;
- ✓ Detectar a presença de cepas patogênicas de *Escherichia coli*, e seus fatores de patogenicidade, em carcaças bovinas em diferentes etapas do abate, em utensílios e equipamentos utilizados no processamento da carne bovina, e em cortes cárneos obtidos ao final do processamento;

**ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: Baixa ocorrência de *Escherichia coli* patogênicas
e contaminação por micro-organismos indicadores de higiene no abate de bovinos
e processamento de carne bovina**

Artigo a ser traduzido para submissão

PÁGINA DE TÍTULO

Baixa ocorrência de *Escherichia coli* patogênicas e contaminação por micro-organismos indicadores de higiene no abate de bovinos e processamento de carne bovina

Frederico Germano Piscitelli Alvarenga Lanna, Marcus Vinícius Coutinho Cossi, Anderson Carlos Camargo, Mariane Rezende Dias, Paulo Sérgio de Arruda Pinto, Luís Augusto Nero*

Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Campus UFV, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

* Autor para correspondência: LA Nero, Email: nero@ufv.br

RESUMO

Considerando a importância que a carne bovina representa para a economia do Brasil, estudos que sejam desenvolvidos na cadeia de produção a fim de garantir qualidade e segurança microbiológica desses produtos são fundamentais. A obtenção de produtos cárneos com qualidade e segurança microbiológica pode garantir a posição do Brasil como maior exportador mundial de carne bovina, possibilitando atender aos critérios internacionais, além de assegurar para a população um produto de alta qualidade e seguro. Dentro desse cenário, o presente estudo visou a avaliação da presença de cepas patogênicas de *E. coli* e a contaminação por micro-organismos indicadores de higiene em diferentes etapas da linha de processamento da carne bovina em 3 frigoríficos localizados no estado de Minas Gerais. Foram encontrados dois isolados de *E. coli* com o gene *stx1* e um isolado com o gene *uidA* (O157:H7). Em relação as contagens de micro-organismos indicadores de higiene, as contagens médias em carcaças mostram um decréscimo considerável entre as etapas I e II, com significativo aumento na etapa III ($p < 0.05$). Embora as médias de contagens em ambiente e processamento tenham sido baixas, as altas contagens de coliformes e *E. coli* nos produtos cárneos embalados evidenciam falhas ou problemas na manipulação desses produtos.

Palavras-chave: *Escherichia coli* patogênica, carne bovina, abate, processamento

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma posição de destaque no cenário internacional de carne bovina, uma vez que é o segundo maior produtor mundial e o principal exportador desse produto (USDA, 2013). Essa atividade determina para o Brasil uma movimentação financeira anual de aproximadamente 170 bilhões de dólares, o que representa aproximadamente 8% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional: esses indicadores evidenciam a tendência de desenvolvimento constante da bovinocultura de corte no Brasil.

Considerando o grande potencial de exportação, os frigoríficos brasileiros que processam carne bovina devem contemplar as exigências dos mercados consumidores. Com o advento do Acordo Sanitário e Fitossanitário em 1995 (*Sanitary and Phytosanitary Agreement*) (WTO, 2013), as exigências internacionais para comércio de alimentos são baseadas principalmente em aspectos de qualidade e segurança, identificados principalmente por características microbiológicas verificadas ao longo da cadeia produtiva dos alimentos e nos produtos finais (Neeliah et al., 2013). Nesse sentido, o monitoramento de micro-organismos indicadores de higiene e patógenos é fundamental para garantia da qualidade e inocuidade dos alimentos produzidos, e consequente garantia do mercado internacional.

Em carne bovina, a pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene ao longo da cadeia produtiva é fundamental em programas de controle de qualidade aplicados pelas indústrias, como análise de perigos e pontos críticos de controle (Buncic et al., 2013; Luning et al., 2011). Quando detectados em diferentes concentrações, esses micro-organismos podem sugerir falhas higiênicas nos processos industriais, ou mesmo manipulação inadequada dos produtos (Brown et al., 2000). Aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e *Escherichia coli* são importantes grupos microbianos que

podem ser monitorados no processamento de carne bovina, e fornecem informações importantes sobre as condições higiênicas desse processo.

Apenas a pesquisa de indicadores de higiene não é considerada suficiente para assegurar a inocuidade dos alimentos. Embora muitos desses indicadores possam sugerir a presença de patógenos, vários estudos tem demonstrado a ausência de relação entre suas altas contagens e a efetiva presença de um micro-organismo patogênico (Barros et al., 2007a; Crowley et al., 2005). Essa evidência determina a necessidade da pesquisa de patógenos específicos na cadeia produtiva dos alimentos, visando a identificação de suas origens e a aplicação de procedimentos adequados para o seu controle. Vários patógenos são associados a carne bovina, porém cepas patogênicas de *Escherichia coli* possuem relevância pela facilidade de contaminação, principalmente por possíveis falhas durante a etapa de evisceração (Cummins et al., 2008). Ainda, países importadores frequentemente exigem análises que atestem a ausência de *E. coli* patogênica em carne bovina (Neeliah et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de cepas patogênicas de *E. coli* e quantificar micro-organismos indicadores de higiene em diferentes etapas do abate de bovinos, processamento de carne bovina e cortes cárneos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Frigoríficos e coleta de amostras

O presente estudo foi conduzido em 3 frigoríficos (Fr01, Fr02, Fr03) localizados no estado de Minas Gerais, Brasil, com abate regular de bovinos realizado sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil).

Entre setembro de 2009 e julho de 2012, os frigoríficos selecionados foram visitados periodicamente para coleta de amostras superficiais de carcaças bovinas em diferentes etapas do abate, utensílios e equipamentos utilizados no processamento de carne bovina, e cortes cárneos embalados (Tabela 1). Cada amostra foi obtida por esfregaço superficial de quatro esponjas estéreis (Dry-sponge, 3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), previamente umedecidas com 10 mL de solução salina (0,85%) peptonada (1%) (SSP) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), em quatro áreas de 100 cm² delimitadas com moldes plásticos estéreis, resultando numa amostragem final de 400 cm² por amostra. Os pontos exatos de amostragem das carcaças são apresentados na Figura 1.

Após obtenção das amostras superficiais, os conjuntos de quatro esponjas por amostra eram acondicionados em uma bag estéril (18-OZ Whirl-Pak Speci-Sponge Environmental Sampling bag Nasco Ltd., Fort Atkinson, WI, EUA) e mantidos sob refrigeração até a execução de análises microbiológicas. Em condições estéreis, cada conjunto de esponjas foram adicionados de 160 mL de SSP (Oxoid) e submetidos a homogeneização, para obtenção de um homogenado final onde 1 mL corresponde a 2 cm².

2.2. Pesquisa de *Escherichia coli* patogênicas

A pesquisa de cepas patogênicas de *E. coli* foi realizada conforme o protocolo descrito no Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2013), com modificações. Alíquotas de 40 mL dos homogenados eram centrifugadas a 1,000 × *g* por 15 min, a 4 °C, com descarte do sobrenadante e suspensão do pellet com 10 mL de caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid) suplementado com novobiocina (Oxoid), com incubação a 41,5 °C por 18 a 24 h, em banho-maria. Em seguida, alíquotas de 1 mL das culturas obtidas eram transferidas para microtubos estéreis de 1,5 mL, e adicionados de 20 µL de

Dynabeads® *E. coli* anti-O157 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA) e submetido à rotação em carrossel por 10 minutos. Os microtubos então eram colocados em estante magnética por 3 min, sendo o sobrenadante retirado com micropipeta estéril, e o pellet submetido a quatro lavagens consecutivas com solução fosfato tamponada Tween (PBS-Tween). Após as lavagens, os microtubos foram retirados da estante magnética, e os pellets homogeneizados com 100 mL de PBS-Tween. Alíquotas das suspensões obtidas foram estriadas em agar MacConkey Sorbitol (SMAC, Oxoid) e agar MacConkey Sorbitol Telurito-Cefexime (TC-SMAC, Oxoid), com incubação a 37 °C por 18 a 24 h. Após incubação, as colônias formadas eram caracterizadas quanto a sua morfologia e pelo menos três colônias de cada tipo eram selecionadas por amostra e submetidas a análises complementares para identificação a nível de espécie, e detecção de genes de virulência.

Cada colônia obtida foi estriada em agar tripticase de soja (TSA, Oxoid) com incubação a 37 °C por 24 h para purificação. Colônias isoladas foram estriadas em agar MacConkey (Oxoid), e colônias fermentadoras de lactose eram submetidas a análises bioquímicas complementares para identificação de *E. coli*: indol, citrato, urease, Voges-Proskauer, vermelho de metila, agar tríplice açúcar ferro e agar lisina ferro (conforme descrito no Bacteriological Analytical Manual) (FDA, 2013).

Culturas que apresentaram perfil bioquímico compatível com *E. coli* foram transferidas para TSB (Oxoid), incubadas a 37 °C por 24 h, e submetidas a extração de DNA utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, EUA), e submetidos a reações de PCR convencionais para identificação de diferentes genes relacionados a patogenicidade: *stx1*, *stx2*, *uidA*, *eaeA*, *ehxA* (Feng & Monday, 2000). Para cada gene, reações de PCR de 25 µL eram compostas por 12,5 µL of GoTaq Green Master Mix (Promega), 6,5 µL de água ultra pura (Promega), 1µL de cada um dos primers para cada gene (a 5 pmol/µL, Tabela 2), e 4 µL de DNA. As

condições de amplificação foram: desnaturação por 3 min a 95°C, 25 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 56°C e 1 min a 72°C, e extensão final de 7 min a 72°C. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v), corados em banho de GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), e visualizados em transiluminador. A presença de produtos de PCR com diferentes tamanhos indicou a presença dos diferentes genes pesquisados (Tabela 2).

2.3. Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene

Todos os homogenados obtidos foram submetidos a diluições seriadas decimais com NaCl 0,85% (m/v). Para cada amostra, duas diluições foram selecionadas e semeadas em Petrifilm™ AC (3M Microbiology) para enumeração de aeróbios mesófilos, Petrifilm™ EB (3M Microbiology) para enumeração de enterobactérias, e Petrifilm™ EC (3M Microbiology) para enumeração de coliformes e *E. coli*. Todas as placas foram incubadas a 35 °C por 24 e 48 h, quando as colônias típicas formadas foram enumeradas. Os resultados finais foram expressos em unidades formadoras de colônias por cm² (UFC/cm²).

As contagens obtidas foram convertidas em log₁₀, e comparadas por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey ($p < 0.05$) para verificação de diferenças significativas entre os frigoríficos analisados e etapas do abate e processamento de carne bovina. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software XLStat (AddinSoft, New York, NY, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a pesquisa de *E. coli* patogênica nas amostras coletadas, 1.366 isolados foram obtidos e submetidos a análises bioquímicas complementares para

identificação de perfis compatíveis com essa espécie. Desse total, 563 isolados apresentaram características bioquímicas compatíveis com *E. coli*, sendo submetidos a testes de PCR para identificação de genes de patogenicidade. Dois isolados apresentaram o gene *stx1* e um isolado o gene *uidA*, sendo obtidos de diferentes amostras e em dois frigoríficos. Em Fr01, uma amostra de carcaça após a sangria foi positiva para *E. coli* com o gene *stx1*, e uma amostra de carcaça após evisceração e separação das meias carcaças foi positiva para *E. coli* com o gene *uidA*. Em Fr02, uma amostra de carcaça após evisceração e separação das meias carcaças foi positiva para *E. coli* com o gene *stx1*. Embora a ocorrência de cepas patogênicas de *E. coli* ter sido considerada baixa, os dados obtidos demonstram que o couro dos animais e a evisceração podem ser importantes pontos de contaminação desses patógenos em frigoríficos (Penney et al., 2007).

A baixa ocorrência de cepas patogênicas de *E. coli* em ambiente de abate de bovinos já foi observada em estudos similares, em diferentes países. Em estudo realizado na França, Guyon et al. (2001) identificaram apenas uma entre 255 amostras de carcaças bovinas como positiva para *E. coli* O157:H7; entretanto, nenhum dos isolados de *E. coli* obtidos apresentaram o gene *stx1*. McEvoy et al. (2004) relataram uma ocorrência de 3,2% de *E. coli* O157:H7 em carcaças bovinas, resultado similar ao encontrado por Carney et al. (2006) em um frigorífico localizado na Irlanda. O gene *uidA* é associado a produção de β -glucuronidase, e o protocolo utilizado no presente estudo detecta uma mutação desse gene que é somente encontrada em cepas de *E. coli* O157:H7 (Feng & Monday, 2000). Arthur et al. (2002) descreveram a ocorrência de 8,3% de amostras de carcaças bovinas positivas para a *E. coli* com o gene *stx1/stx2* e não-O157:H7. Rogerie et al. (2001) também reportaram baixa prevalência (1,9 %) de *E. coli* positivas para *stx1/stx2* em carcaças bovinas, similar ao resultado encontrado por Leung et al. (2001) em Hong Kong. No Brasil, Rigobelo et al. (2006) encontram apenas

uma entre 80 amostras de carcaças bovinas com resultado positivo para *E. coli* com o gene *stx2*. Os genes *stx1* e *stx2* são responsáveis pela produção das toxinas Stx1 e Stx2, respectivamente. Estas toxinas são as mais usualmente associadas a patologia em humanos e consideradas as toxinas mais relevantes em cepas patogênicas de *E. coli* (Feng & Monday, 2000).

Embora não tenha sido identificada nenhuma amostra com resultado positivo para *E. coli* com *eaeA* ou *ehxA*, esses genes são responsáveis por importantes fatores de patogenicidade dessa espécie. O gene *eaeA* é considerado um fator de virulência por ser responsável pela produção da intimina, que é uma proteína essencial para a adesão celular nos enterócitos (Guyon et al., 2001). O gene *ehxA* é responsável por codificar uma toxina conhecida com entero-hemolisina, cuja os mecanismos de patogenicidade ainda não foram totalmente esclarecidos (Rogers et al., 2009).

Apesar da baixa ocorrência de cepas patogênicas de *E. coli*, foi verificada diferentes níveis de contaminação por microrganismos indicadores de higiene nas mesmas amostras (Figuras 2 e 3, Tabelas 3 e 4). Nas diferentes etapas do abate (Figura 2 e Tabela 3), pode ser verificado de maneira geral que as contagens dos diferentes grupos microbianos avaliados foram estatisticamente superiores no início dos processos (etapa I: após a sangria) (Figura 2). Em relação a aeróbios mesófilos foi verificado um aumento das contagens entre as etapas de remoção do couro (etapa II) e a evisceração e divisão das meias carcaças (etapa III) (Figura 2). Porém, a variação das contagens de aeróbios mesófilos ao longo do processo de abate variou entre os diferentes frigoríficos (Tabela 3). Enterobactérias apresentaram aumento das contagens em Fr02 e Fr03 após a lavagem final (etapa IV) (Tabela 3). Coliformes e *E. coli* apresentaram um mesmo padrão de contagens, com redução significativa a partir da etapa de remoção do couro (etapa II) nos três frigoríficos analisados (Tabela 3).

Outros estudos demonstraram a relevância do couro dos animais como importantes fontes de contaminação por micro-organismos indicadores de higiene (Byrne et al., 2000; Elder et al., 2000; Serraino et al., 2012). No Reino Unido, McEvoy et al. (2004) encontrou um padrão semelhante da distribuição da contaminação por micro-organismos indicadores de higiene em diferentes etapas da linha de abate, e também evidenciou que a remoção do couro promove uma redução considerável na contaminação, porém com um aumento após evisceração e separação das metades da carcaça. Na Irlanda, Tergney & Bolton (2006) analisaram ao longo de 6 meses a contaminação por micro-organismos indicadores de higiene em 180 carcaças ao final do processamento, quando evidenciaram que a remoção do couro e a evisceração são os principais pontos críticos na linha de abate de bovinos.

Comparando os resultados obtidos nesse estudo com os valores exigidos pelo Regulamento 2073 da União Europeia (European-Community, 2005), é possível identificar os níveis de contaminação das carcaças por aeróbios mesófilos apresentaram-se dentro dos limites aceitáveis (3.5 a 5.0 log UFC/cm²) (Figura 2, Tabela 3). Em relação a enterobactérias, cuja contaminação também é regulamentada pela legislação europeia, as carcaças apresentaram contaminação média entre o intervalo considerado aceitável (1.5 a 2.5 log UFC/cm²) (Figura 2, Tabela 3). Embora tenham sido observadas variações nas contagens dos micro-organismos indicadores de higiene nas carcaças bovinas ao longo da linha de abate, os níveis finais de contaminação não foram superiores a limites referenciais usualmente utilizados para o controle de qualidade (European-Community, 2005), indicando procedimentos higiênicos adequados durante essas etapas. Essa observação pode ser confirmada pelas contagens médias de coliformes e *E. coli* nas carcaças ao final do processo de abate, que não foram superiores a 2 log UFC/cm² (Gill, 1998).

As amostras obtidas no ambiente de processamento de carne bovina em Fr01 apresentaram aumento das contagens dos micro-organismos indicadores de higiene pesquisados entre as etapas avaliadas (antes e durante o processamento) (Tabela 4). O aumento dessas contagens indica ausência de higienização constante de utensílios e equipamentos utilizados no processamento de carne bovina, o que pode representar focos de contaminação nesse local, assim como para os cortes cárneos finais a serem obtidos. Resultados similares foram observados por Barros et al. (2007b), que identificaram diferentes utensílios e equipamentos no ambiente de processamento de carne bovina como importantes fontes de contaminação por micro-organismos indicadores de higiene.

As contagens de micro-organismos indicadores de higiene observadas nos cortes cárneos podem ser consideradas consequências da contaminação verificada nas etapas finais do abate e no ambiente de processamento de carne bovina (Figura 3). Embora as contagens médias de aeróbios mesófilos e enterobactérias não tenham sido superiores a 5 log UFC/cm², coliformes e *E. coli* apresentaram contagens médias superiores a 2 log UFC/cm², indicando problemas higiênicos na manipulação e conservação desses produtos (Gill, 1998). Barros et al. (2007b) encontraram contagens médias de micro-organismos indicadores de higiene abaixo das contagens observadas no presente estudo (Figura 3). Embora tenham sido observadas altas contagens médias de coliformes e *E. coli* nos cortes cárneos, é importante destacar a ausência de cepas patogênicas de *E. coli* nessas amostras.

Os dados obtidos permitem concluir que a frequência de cepas patogênicas de *E. coli* em carcaças bovinas, ambiente de processamento de carne bovina e cortes cárneos pode ser considerada baixa. Embora tenham sido identificadas variações nos níveis de contaminação por micro-organismos indicadores de higiene durante as diferentes etapas do abate, após a lavagem final as carcaças apresentaram contagens consideradas

aceitáveis. Porém, as variações significativas nas contagens no ambiente de processamento de carne bovina determinaram altas contagens de coliformes e *E. coli* nos cortes cárneos embalados, indicando falhas higiênicas na manipulação e conservação desses produtos.

REFERÊNCIAS

- Arthur, T.M., Barkocy-Gallagher, G.A., Rivera-Betancourt, M., & Koohmaraie, M., 2002. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4847-4852.
- Barros, M.A.F., Nero, L.A., Manoel, A.V.-B., d'Ovídio, L., Silva, L.C., Franco, B.D.G.M., & Beloti, V., 2007a. *Listeria* spp. associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:603-609.
- Barros, M.A.F., Nero, L.A., Monteiro, A.A., & Beloti, V., 2007b. Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 27:856-862.
- Brown, M.H., Gill, C.O., Hollingsworth, J., Nickelson Ii, R., Seward, S., Sheridan, J.J., Stevenson, T., Sumner, J.L., Theno, D.M., Usborne, W.R., & Zink, D., 2000. The role of microbiological testing in systems for assuring the safety of beef. *International Journal of Food Microbiology* 62:7-16.
- Buncic, S., Nychas, G.-J., Lee, M.R.F., Koutsoumanis, K., Hébraud, M., Desvaux, M., Chorianopoulos, N., Bolton, D., Blagojevic, B., & Antic, D., 2013. Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances. *Meat Science*.

- Byrne, C.M., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., & Blair, I.S., 2000. The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. *Letters in Applied Microbiology* 30:142-145.
- Carney, E., O'Brien, S.B., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S., & Duffy, G., 2006. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food Microbiology* 23:52-59.
- Crowley, H., Cagney, C., Sheridan, J.J., Anderson, W., McDowell, D.A., Blair, I.S., Bishop, R.H., & Duffy, G., 2005. Enterobacteriaceae in beef products from retail outlets in the Republic of Ireland and comparison of the presence and counts of *E. coli* O157:H7 in these products. *Food Microbiology* 22:409-414.
- Cummins, E., Nally, P., Butler, F., Duffy, G., & O'Brien, S., 2008. Development and validation of a probabilistic second-order exposure assessment model for *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef trimmings from Irish meat plants. *Meat Science* 79:139-154.
- Elder, R.O., Keen, J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher, G.A., Koohmaraie, M., & Laegreid, W.W., 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:2999-3003.
- European-Community, 2005. Commission Regulation n. 2073/2005 of 15 november 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, p. 1, Official Journal of the European Union.
- FDA, 2013. Bacteriological Analytical Manual, Diarrheogenic *Escherichia coli*. Food and Drug Administration, Washington.

- Feng, P. & Monday, S.R., 2000. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Molecular and Cellular Probes* 14:333-337.
- Gill, C.O., 1998. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs, p. 118-157. In: Davies, A. & Board, R. (Eds.), *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic and Professional, London.
- Guyon, R., Dorey, F., Malas, J.P., Grimont, F., Foret, J., Rouvière, B., & Collobert, J.F., 2001. Superficial contamination of bovine carcasses by *Escherichia coli* O157:H7 in a slaughterhouse in Normandy (France). *Meat Science* 58:329-331.
- Leung, P.H.M., Yam, W.C., Ng, W.W.S., & Peiris, J.S.M., 2001. The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. *Epidemiology & Infection* 126:173-179.
- Luning, P.A., Jacxsens, L., Rovira, J., Osés, S.M., Uyttendaele, M., & Marcelis, W.J., 2011. A concurrent diagnosis of microbiological food safety output and food safety management system performance: Cases from meat processing industries. *Food Control* 22:555-565.
- McEvoy, J.M., Sheridan, J.J., Blair, I.S., & McDowell, D.A., 2004. Microbial contamination on beef in relation to hygiene assessment based on criteria used in EU Decision 2001/471/EC. *International Journal of Food Microbiology* 92:217-225.
- Neeliah, S.A., Neeliah, H., & Goburdhun, D., 2013. Assessing the relevance of EU SPS measures to the food export sector: Evidence from a developing agro-food exporting country. *Food Policy* 41:53-62.
- Penney, N., Bigwood, T., Barea, H., Pulford, D., LeRoux, G., Cook, R., Jarvis, G., & Brightwell, G., 2007. Efficacy of a peroxyacetic acid formulation as an antimicrobial

- intervention to reduce levels of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 on external carcass surfaces of hot-boned beef and veal. *Journal of Food Protection* 70:200-203.
- Rigobelo, E.C., Stella, A.E., Ávila, F.A., Macedo, C., & Marin, J.M., 2006. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 110:194-198.
- Rogerie, F., Marecat, A., Gambade, S., Dupond, F., Beaubois, P., & Lange, M., 2001. Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. *International Journal of Food Microbiology* 63:217-223.
- Rogers, M.T., Zimmerman, R., & Scott, M.E., 2009. Histone-like nucleoid-structuring protein represses transcription of the ehx operon carried by locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-expressing *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* 47:202-211.
- Serraino, A., Bardasi, L., Riu, R., Pizzamiglio, V., Liuzzo, G., Galletti, G., Giacometti, F., & Meriardi, G., 2012. Visual evaluation of cattle cleanliness and correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. *Meat Science* 90:502-506.
- Tergney, A. & Bolton, D.J., 2006. Validation studies on an online monitoring system for reducing faecal and microbial contamination on beef carcasses. *Food Control* 17:378-382.
- USDA, 2013. U. S. Department of Agriculture - Agency Reports.
- WTO, 2013. Understanding the WTO Agreement on Sanitary and Phytosanitary Measures. World Trade Organization.

Tabela 1. Números de amostras superficiais obtidas em diferentes locais e etapas do abate de bovinos e processamento de carne bovina em três frigoríficos localizados no estado de Minas

Gerais, Brasil.

ambiente	amostra	etapa*	frigorífico			total
			Fr01	Fr02	Fr03	
abate	carcaça	I	69	70	70	209
	carcaça	II	69	70	70	209
	carcaça	III	69	70	70	209
	carcaça	IV	69	70	70	209
processamento	mesa	antes	39	-	-	39
		durante	39	-	-	39
	faca	antes	13	-	-	13
		durante	13	-	-	13
	mãos	antes	37	-	-	37
		durante	37	-	-	37
	alcatra		32	-	-	32
	paleta		32	-	-	32
	filé mignon		30	-	-	30

* etapas do abate: I) após sangria, II) após remoção do couro, III) após evisceração e divisão de carcaça, IV) após lavagem final. Etapas do processamento: para todas as amostras, as coletas foram realizadas antes do início das atividades, e durante a execução das atividades de manipulação e processamento das carcaças.

Tabela 2. Genes alvo, tamanhos dos produtos de amplificação, primers e suas sequencias utilizados na detecção do potencial patogênico de isolados de *Escherichia coli* obtidos de carcaças bovinas, ambiente de processamento de carne bovina, e cortes cárneos embalados.

gene	produtos	primer	Sequencia	referência
<i>stx1</i>	348bp	LP30	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	Cebula et al. (1995)
		LP31	CACCAGACAATGTAACCGCTG	
<i>stx2</i>	584bp	LP43	ATCCTATTCCCAGGAGTTTACG	Cebula et al. (1995)
		LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	
<i>uidA</i>	252bp	PT-2	GCGAAAACACTGTGGAATTGGG	Cebula et al. (1995)
		PT-3	TGATGCTCCATCACTTCCTG	
<i>eaeA</i>	397bp	AE22	ATTACCATCCACACAGACGGT	Fratamico & Strobaugh (1998)
		AE20-2	ACAGCGTGGTTGGATCAACCT	
<i>ehxA</i>	158bp	MFS1Fb	GTTTATTCTGGGGCAGGCTC	Feng et al. (2000)
		MFS1R	CTTCACGTCACCATACATAT	

Tabela 3. Médias de contagens de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e *Escherichia coli* em diferentes etapas do abate de bovinos em três frigoríficos localizados no estado de Minas Gerais, Brasil.

grupo microbiano	etapa do abate*	Frigorífico			ANOVA
		Fr01	Fr02	Fr03	
aeróbios mesófilos	I	4.9 ± 1.0 ^{a,A}	3.9 ± 0.8 ^{a,B}	4.7 ± 0.9 ^{a,A}	$F_{(2,191)} = 22.3, p < 0.001$
	II	2.8 ± 0.8 ^{c,A}	2.8 ± 1.0 ^{b,A}	3.0 ± 0.8 ^{c,A}	$F_{(2,141)} = 0.8, p = 0.430$
	III	3.6 ± 1.6 ^{b,A}	3.1 ± 1.1 ^{b,A,B}	3.0 ± 1.0 ^{c,B}	$F_{(2,139)} = 3.1, p = 0.049$
	IV	3.1 ± 0.9 ^{b,c,A}	3.6 ± 1.0 ^{a,A}	3.6 ± 1.1 ^{b,A}	$F_{(2,161)} = 2.8, p = 0.062$
	ANOVA	$F_{(3,181)} = 35.5, p < 0.0001$	$F_{(3,217)} = 13.8, p < 0.0001$	$F_{(3,234)} = 47.8, p < 0.0001$	
enterobactérias	I	3.9 ± 1.4 ^{a,A}	2.8 ± 1.1 ^{a,B}	3.3 ± 0.9 ^{a,B}	$F_{(2,171)} = 19.8, p < 0.001$
	II	2.1 ± 1.2 ^{b,A}	2.1 ± 0.9 ^{b,A}	1.5 ± 0.9 ^{c,A}	$F_{(2,92)} = 3.5, p = 0.033$
	III	2.3 ± 1.4 ^{b,A}	2.1 ± 0.8 ^{b,A}	1.8 ± 1.0 ^{c,A}	$F_{(2,127)} = 2.7, p = 0.069$
	IV	2.0 ± 1.0 ^{b,A}	2.4 ± 1.0 ^{a,b,A}	2.3 ± 0.9 ^{b,A}	$F_{(2,158)} = 1.6, p = 0.201$
	ANOVA	$F_{(3,157)} = 24.4, p < 0.0001$	$F_{(3,179)} = 5.1, p = 0.002$	$F_{(3,212)} = 37.9, p < 0.0001$	
coliformes	I	3.6 ± 1.5 ^{a,A}	2.8 ± 1.0 ^{a,B}	3.2 ± 1.0 ^{a,A,B}	$F_{(2,157)} = 6.6, p = 0.002$
	II	1.9 ± 1.1 ^{b,A}	1.8 ± 1.0 ^{b,A}	1.4 ± 0.7 ^{c,A}	$F_{(2,76)} = 2.0, p = 0.146$
	III	2.3 ± 1.3 ^{b,A}	1.9 ± 0.8 ^{b,A}	1.7 ± 1.0 ^{b,c,A}	$F_{(2,103)} = 2.7, p = 0.072$
	IV	1.8 ± 0.9 ^{b,A}	2.1 ± 0.9 ^{b,A}	2.0 ± 1.1 ^{b,A}	$F_{(2,138)} = 0.9, p = 0.400$
	ANOVA	$F_{(3,131)} = 16.9, p < 0.0001$	$F_{(3,159)} = 9.7, p < 0.0001$	$F_{(3,184)} = 29.0, p < 0.0001$	
<i>Escherichia coli</i>	I	3.5 ± 1.4 ^{a,A}	2.6 ± 1.0 ^{a,B}	3.0 ± 1.0 ^{a,B}	$F_{(2,152)} = 6.6, p = 0.002$
	II	2.0 ± 0.9 ^{b,A}	1.9 ± 0.8 ^{b,A}	1.3 ± 0.7 ^{b,B}	$F_{(2,63)} = 4.2, p = 0.019$
	III	2.1 ± 1.3 ^{b,A}	1.7 ± 0.8 ^{b,A}	1.6 ± 0.9 ^{b,A}	$F_{(2,79)} = 1.4, p = 0.254$
	IV	1.6 ± 0.7 ^{b,A}	1.5 ± 0.6 ^{b,A}	1.8 ± 1.2 ^{b,A}	$F_{(2,81)} = 1.2, p = 0.312$
	ANOVA	$F_{(3,116)} = 18.1, p < 0.0001$	$F_{(3,114)} = 11.7, p < 0.0001$	$F_{(3,145)} = 22.7, p < 0.0001$	

* etapas do abate: I) após sangria, II) após remoção do couro, III) após evisceração e divisão de carcaça, IV) após lavagem final. Médias acompanhadas de letras maiúsculas distintas numa mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0.05$); médias acompanhadas de letras minúsculas distintas numa mesma coluna (por grupo microbiano) são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabela 4. Médias de contagens de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e *Escherichia coli* em utensílios e ambiente de processamento de carne bovina, antes e durante a execução de atividades de manipulação e processamento em um frigorífico localizado no estado de Minas Gerais, Brasil

amostra	etapa	aeróbios mesófilos	enterobactérias	coliformes	<i>Escherichia coli</i>
faca	antes	2.4 ± 1.4	2.6 ± 1.1	2.1 ± 0.6	-
	durante	4.3 ± 1.6	4.0 ± 1.3	3.1 ± 1.7	3.0 ± 1.3
	ANOVA	F _(1,20) = 8.5, p = 0.009	F _(1,13) = 3.835, p = 0.072	F _(1,13) = 1.1, p = 0.306	-
mesa	antes	2.6 ± 1.2	2.7 ± 0.7	1.7 ± 0.6	1.5 ± 0.7
	durante	4.9 ± 1.4	3.8 ± 1.3	3.4 ± 1.3	3.1 ± 1.2
	ANOVA	F _(1,37) = 24.3, p < 0.0001	F _(1,27) = 3.0, p = 0.093	F _(1,29) = 9.6, p = 0.004	F _(1,19) = 3.0, p = 0.098
mão	antes	2.9 ± 1.4	2.3 ± 1.4	2.0 ± 1.1	1.5 ± 0.2
	durante	4.8 ± 1.2	3.6 ± 1.1	3.2 ± 0.8	1.7 ± 0.8
	ANOVA	F _(1,56) = 31.7, p < 0.0001	F _(1,43) = 12.1, p = 0.001	F _(1,39) = 16.8, p = 0.0	F _(1,17) = 3.9, p = 0.064

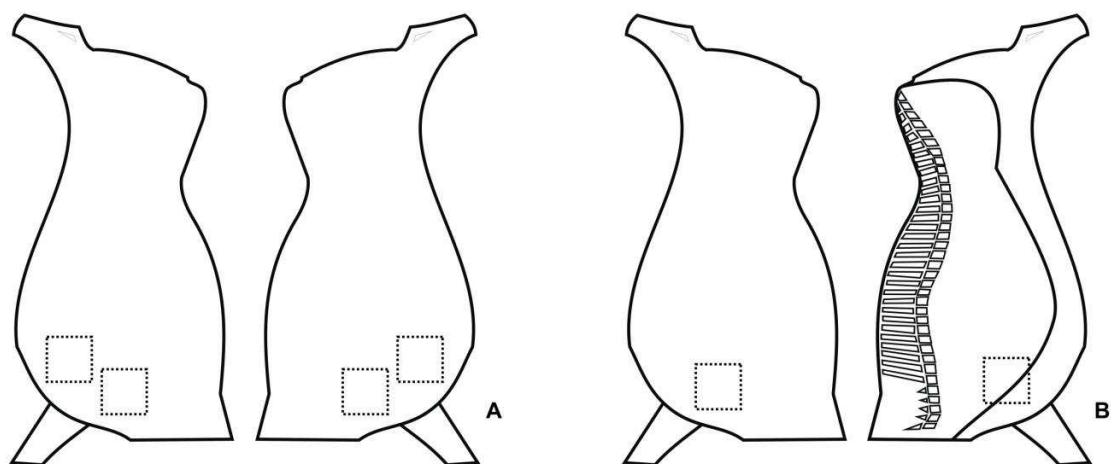


Figura 1. Localização dos pontos de coleta de amostras superficiais em carcaças bovinas (quadrados com linhas pontilhadas) na calha de sangria e após esfola (A, representando a carcaça inteira, de ambos os lados), e após evisceração/separação das carcaças e lavagem (B, representando uma meia carcaça, no lado externo e interno).

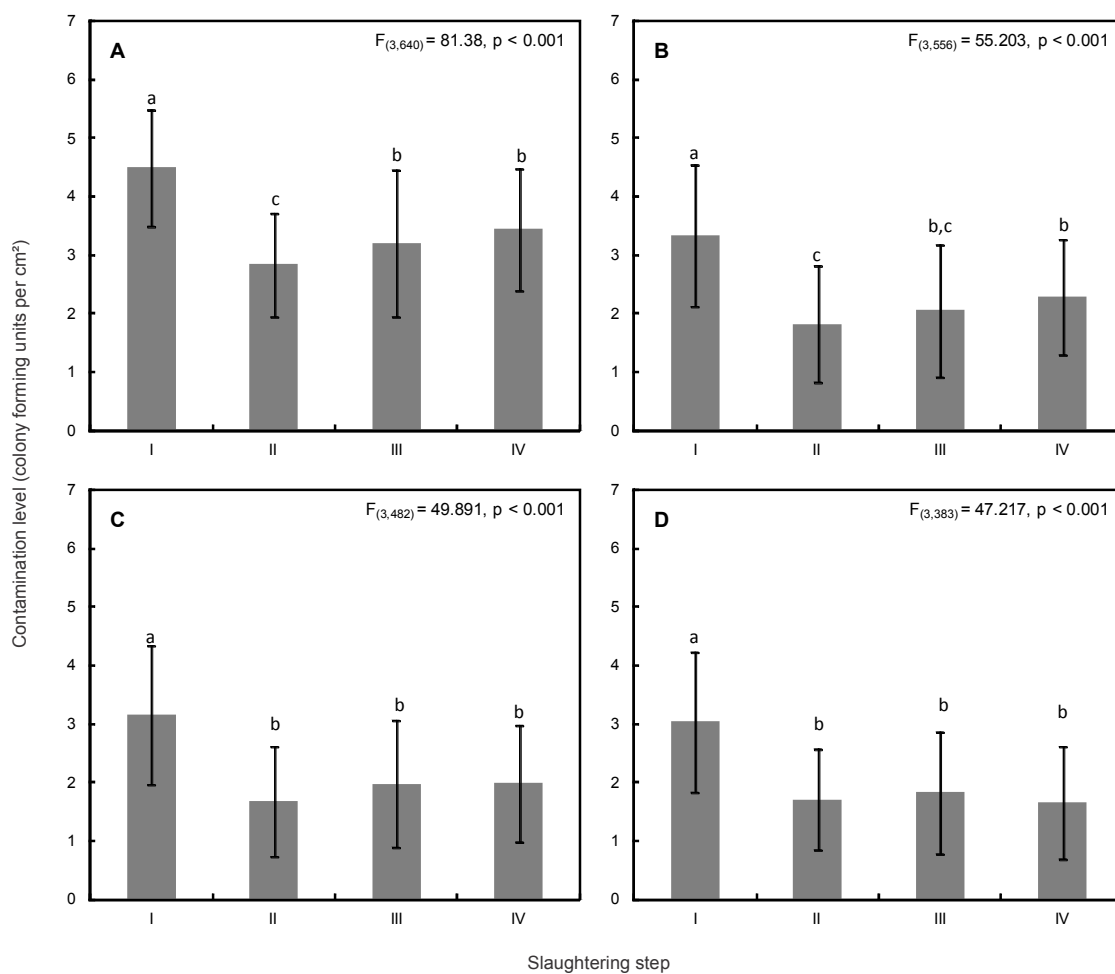


Figura 2. Médias de contagens de aeróbios mesófilos (A), enterobactérias (B), coliformes (C), e *Escherichia coli* (D) em carcaças bovinas amostradas em diferentes etapas do abate (I: após sangria, II: após remoção do couro, III) após evisceração e separação de meias carcaças, e IV) após lavagem final). Em cada gráfico, médias acompanhadas de letras distintas são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

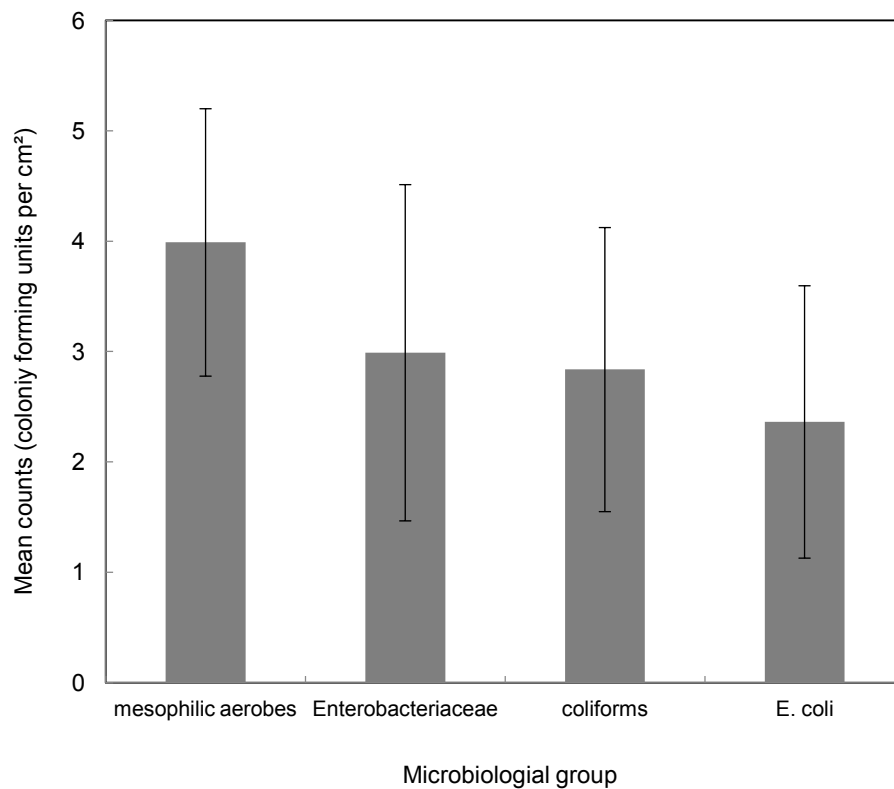


Figura 3. Médias de contagens de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e *Escherichia coli* em cortes cárneos embalados obtidos em um frigorífico localizado no estado de Minas Gerais, Brasil.