



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

Escherichia coli ENTEROPATOGÊNICAS EM CARÇAÇAS DE
OVINOS E NA ÁGUA UTILIZADA PARA LAVAGEM DAS CARÇAÇAS

MÁRCIA MONKS JANTZEN

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas, sob
a orientação do Prof. Dr. Wladimir
Padilha da Silva, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia

Agroindustrial, para obtenção do título
de Mestre em Ciências (M.S.)

PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Maio de 2002

I. INTRODUÇÃO GERAL

Os alimentos estão entre os principais fatores de desenvolvimento de uma população. A formação de um indivíduo forte e sadio está baseada em uma alimentação que contenha elementos essenciais como proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas, sais minerais e água (Hobbs & Roberts, 1998). Uma alimentação saudável garante a reposição de energias e diminui a susceptibilidade à instalação de doenças. Além de contribuir para a manutenção da saúde da população, o setor agroindustrial alavanca a economia de um país através da comercialização e exportação de seus excedentes (Germano & Germano, 2001). No contexto histórico, os alimentos também sofreram modificações na sua forma de processamento e consumo. Consumidores mais exigentes levaram a indústria a produzir alimentos com maior qualidade e a uma diversidade de produtos. A

industrialização trouxe benefícios em termos de praticidade, porém, também vieram problemas quando a condução dos processos industriais é realizada de forma incorreta. Outro inconveniente compete ao alongamento da cadeia alimentar, devido à diversificação das fases intermediárias entre a produção da matéria-prima e o consumo do alimento (Hobbs & Roberts, 1998).

A população em geral está permanentemente exposta a riscos de toxinfecções através do alimento que consome, que podem ou não ser causados por microrganismos. Quando for de origem microbiana, estes microrganismos

causadores de doenças podem estar em qualquer etapa da cadeia produtiva (ICMSF, 1997). Entretanto, é comum que a maior concentração microbiana esteja no final da cadeia, ou seja, em nível de varejo. Não é difícil detectar a causa, já que o produto passou maior tempo exposto a abusos de temperatura (Germano & Germano, 2001). A alta contagem de microrganismos presente nos alimentos, quando expostos nos balcões frigoríficos do comércio, origina-se, principalmente, na fase inicial de produção, onde há grande probabilidade de contaminação a partir da água, dos manipuladores e utensílios. Dessa forma, torna-se decisiva a preservação da segurança sanitária do alimento através do controle dos processos no interior da agroindústria. Essas ações podem evitar a formação de metabólitos bacterianos indesejáveis ao consumo e diminuição da multiplicação microbiana, reduzindo assim o risco de instalação de doenças na população, que por algumas vezes podem ser fatais (ICMSF, 1997).

A primeira etapa de processamento do alimento é na indústria beneficiadora, a qual irá transformar o produto bruto em próprio para o consumo humano. A planta frigorífica é um local onde diferentes práticas de processamento culminam em um produto frescal, que requer apenas o tratamento térmico doméstico para seu consumo ou em uma matéria-prima que ainda passará por novas etapas de processamento e manipulação até chegar aos balcões frigoríficos do comércio. Esse fato exige ainda mais que o produto tenha o mínimo de contaminação microbiana, já que passará por novas etapas de manipulação.

A contaminação de uma carcaça pode vir do próprio animal, através do conteúdo gastrointestinal (GI) ou das patas, pêlos ou lã (Bell *et al.*, 1993). Outra forma de contaminação seria através do ambiente da planta de abate ou dos funcionários. Para minimizar a contaminação da carcaça através do conteúdo GI e da região externa do animal, o abatedouro divide-se em duas áreas principais: área suja e área limpa. Porém, se o trânsito de funcionários de uma área para outra não ocorrer somente no sentido área limpa-área suja, eles podem funcionar como veículo de transmissão de patógenos para a carcaça. Outra forma comum de transmissão é através dos manipuladores que por muitas vezes, deixam de praticar ações básicas de higiene dentro do ambiente de processamento.

O uso da água devidamente clorada para a descontaminação e limpeza das carcaças é empregado há bastante tempo pelos frigoríficos no Brasil. O controle da cloração e da pressão da água diminui os riscos da permanência dos microrganismos na superfície do produto (Castillo, 1998).

Segundo Germano & Germano (2001), registros da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstram que são detectados anualmente, em países desenvolvidos, mais de 1 bilhão de casos de diarreia aguda em crianças menores de 5 anos, das quais 5 milhões chegam a óbito. Calcula-se que de 1 milhão a 100 milhões de indivíduos contraem infecções e intoxicações através do consumo de refeições e água de bebida.

Dentre os microrganismos mais importantes entre os causadores de toxinfecções alimentares está *Escherichia coli*, que é um cocobacilo Gram negativo da família Enterobacteriaceae, presente na microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente (Franco & Landgraf, 1996). Através do isolamento e enumeração dessa bactéria, pode-se prever se as condições higiênico-sanitárias do produto estão aceitáveis para o consumo humano. Outro aspecto importante de sua presença no alimento é que diversas linhagens de *E. coli* são enteropatogênicas para o homem e os animais. *Escherichia coli* pode causar infecções intestinais, urinárias, septicemias, meningites e outros tipos de infecções (Campos & Trabulsi, 1999).

Na indústria de alimentos, o controle de bactérias patogênicas tem importância na saúde pública e na comercialização de produtos para compradores que exigem sistemas que garantam a qualidade sanitária dos alimentos. Para isso, têm sido utilizadas tanto metodologias clássicas de isolamento microbiano quanto metodologias rápidas que permitem a leitura de resultados em 24 a 48 h, auxiliando o controle da higiene dos processos e a liberação de lotes para a venda.

A identificação de *E. coli* revela a contaminação fecal do produto, mas não demonstra se as bactérias pertencem a sorogrupos potencialmente enteropatogênicos ao homem. Devido a isso, em estudos epidemiológicos, é importante que se saiba o sorogrupo predominante do microrganismo, pois essas

constatações podem auxiliar a prever os tipos de risco que a população consumidora possa estar exposta.

O tipo de doença causada por *E. coli* está relacionado com fatores de virulência como a presença de adesinas ou fatores de colonização, a capacidade para invadir as células epiteliais do intestino grosso, a produção de hemolisinas e a produção de toxinas termoestáveis, termolábeis, Verotoxina 1 e Verotoxina 2 (Bell & Kyriakides, 2000).

Dentre as *E. coli* enteropatogênicas, existem as enterohemorrágicas, que são um subtipo de *E. coli* produtora de verotoxina (VTEC), toxina semelhante a de *Shigella dysenteriae*, conhecida pela sua toxicidade quando inoculada em células Vero. Alguns sorotipos pertencentes a VTEC são extremamente patogênicos por ação da verotoxina, a qual pode levar o paciente a complicações renais como síndrome hemolítico-urêmica ou colite hemorrágica (Levine, 1987). Devido a sua potente ação no hospedeiro, é importante que se detecte sua presença no estudo da prevalência de *E. coli* a fim de se tomar conhecimento da significância do risco que os consumidores estão expostos.

O USDA-FSIS (1996c) relatou que *E. coli* não-patogênica é o indicador de contaminação fecal mais apropriado em carcaças de aves e de bovinos e que as fezes são o veículo mais comum em que bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli* O157 alcançam os produtos. *E. coli* foi escolhida pelo USDA-FSIS (1996d) para ser o indicador de contaminação fecal por: (i) ser útil para se certificar de que os parâmetros de processo estão sob controle; (ii) as análises são fáceis e não têm custo elevado; e (iii) seus níveis podem ser facilmente quantificados, o que não ocorre com muitos outros patógenos.

No trabalho a seguir iremos discutir estes assuntos na forma de capítulos, onde cada um aborda um experimento realizado. Primeiramente, será feita uma correlação entre os fatores ambientais dos frigoríficos e a enumeração de coliformes nas amostras superficiais das carcaças e na água de lavagem destas carcaças. No segundo capítulo, serão abordadas as metodologias adotadas para a detecção da bactéria nas carcaças e na água usada para a lavagem dessas, realizando uma comparação entre métodos de contagem de *E. coli*.

A definição dos sorogrupos encontrados e a detecção da produção de Verotoxinas serão discutidos no capítulo três.

II. METODOLOGIA GERAL

Para o estudo da prevalência de *Escherichia coli* patogênicas em carcaças de ovinos abatidos em frigoríficos sob inspeção estadual, foram coletadas amostras de superfície de carcaças provenientes de 4 abatedouros. Foram realizadas 6 visitas aos frigoríficos, sendo que em cada uma delas foram coletadas dez amostras das carcaças e uma da água utilizada para a lavagem das mesmas. Nos Frigoríficos 1, 2 e 4, foram coletadas 10 amostras de cada e no Frigorífico 3, 30 amostras, por ser este o frigorífico que abatia o maior volume de ovinos. O total de amostras analisadas foi de 60 carcaças e 12 de água de lavagem: 6 para análise microbiológica e 6 para determinação da concentração de cloro residual.

Foi aplicado um questionário de cunho epidemiológico para avaliar as condições de higiene, do prédio, dos equipamentos e dos funcionários. Esses dados epidemiológicos foram correlacionados aos de enumeração de Coliformes totais, Coliformes fecais e *E. coli* das carcaças, assim como aos de mesófilos aeróbios facultativos, Coliformes totais, Coliformes fecais e *E. coli*, e também a concentração de cloro residual da água de lavagem das carcaças. Também pesquisou-se a presença de sorogrupos enteropatogênicos e produtores de Verotoxina nas amostras de carcaças.

A enumeração de *E. coli* nas carcaças foi realizada através da metodologia padrão do Número Mais Provável (NMP), indicada pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Brasil, 1993). Paralelamente, testou-se uma metodologia rápida de enumeração desses microrganismos, denominada Petrifilm™ EC da indústria 3M.

A água de lavagem das carcaças foi avaliada microbiologicamente através da contagem de mesófilos aeróbios facultativos, de Coliformes totais, Coliformes fecais e de *Escherichia coli* (BAM, 1998). Também foi analisada a concentração de cloro residual pelo método iodeto amido (APHA, 1992a).

A análise estatística foi realizada conforme as recomendações de Book (1977) e Vieira (1999), com análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tuckey, para se verificar diferenças significativas entre o resultado (metodologia tradicional) da média de microrganismos nas amostras de carcaças dos frigoríficos abatedouros analisados. Também foi aplicado teste “t” (Student) para dados pareados para comparação da metodologia tradicional com o método Petrifilm™ nos resultados de enumeração de Coliformes totais e *E. coli*, seguido da determinação do coeficiente de correlação (r).

O sorogrupo ao qual pertenceram as cepas, foi investigado com o auxílio de soros polivalentes (PROBAC), específicos para *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC A, EPEC B e EPEC C) , para *E. coli* enteroinvasora (EIEC A e EIEC B) e para *E. coli* O157. As cepas que não reagiram a nenhum dos sorogrupos comercialmente disponíveis foram, então, testadas quanto a produção de verotoxina pela técnica de inoculação do substrato bacteriano em células Vero, conforme metodologia descrita por Blanco et al. (1996).

CAPÍTULO 1

CORRELAÇÃO ENTRE OS FATORES AMBIENTAIS DE ABATEDOUROS E A CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES FECAIS E *E. coli*

1. INTRODUÇÃO

As condições sanitárias de carcaças dependem das práticas e do ambiente de abate. A água de lavagem utilizada para a descontaminação e limpeza de carcaça pode agir como veículo de contaminação se não estiver devidamente clorada. A Portaria 1469 de 29 de dezembro de 2000 (Brasil, 2001) descreve o padrão para água potável, onde está descrito que, após a desinfecção, a água deve conter um teor mínimo de cloro residual livre de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo obrigatória a manutenção de, no mínimo, $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ em qualquer ponto da rede de distribuição.

Para os estabelecimentos sob fiscalização do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, a água clorada deve ter os padrões de

potabilidade, devendo haver de 0,4 a 0,5 mg Cl⁻.L⁻¹, com máximo de 1,0 mg Cl⁻.L⁻¹. Anteriormente, empregava-se a hipercloração da água para a lavagem de carcaças, com cloro na concentração de 5,0 a 10 mg.L⁻¹, porém, o Regulamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) não recomenda a utilização dessas concentrações de cloro para evitar a formação de compostos clorados na carne (Brasil, 2001).

Mesmo com todo o esforço que pode ser dispensado, a exposição das carcaças a contaminantes durante o processo de abate é um fato inevitável (Cabedo *et al.*, 1996), sendo impossível um produto isento de microrganismos em nível comercial. Esta contaminação pode ser por microrganismos deteriorantes, que causam uma redução na vida de prateleira e na qualidade do produto, ou por microrganismos patogênicos, principal razão das ações de fiscalização pelos órgãos responsáveis pela manutenção da segurança apresentada pelos alimentos com relação à saúde pública.

A construção predial de um abatedouro pode auxiliar o controle da disseminação de microrganismos. Medidas simples como a integridade de telas nas aberturas, evitam a entrada de vetores nas instalações; local apropriado para a lavagem de mãos e botas localizada na única entrada do abatedouro pode evitar a introdução de patógenos externos. Os próprios funcionários que estão em contato direto com as carcaças devem ter consciência de ações que evitem a contaminação do produto. O treinamento e conscientização em Boas Práticas de Fabricação (BPF) ajudam no controle e manutenção da higiene e qualidade sanitária dos alimentos.

Durante o abate, as carcaças podem contaminar-se por conteúdo fecal através do seu contato com as porções externas do animal (lã, patas), após a esfolagem, ou através do rompimento de vísceras abdominais. Alguns cuidados e medidas corretivas podem diminuir o risco dessa contaminação, como a excisão das porções contaminadas na superfície da carcaça.

A principal bactéria indicadora de contaminação fecal é *Escherichia coli*. Esta bactéria se encontra, habitualmente, em ambientes externos (terra e água), em decorrência da atividade humana e animal e a sua presença nas redes de

abastecimento d'água tem sido utilizada, há muitas décadas, como indicador de contaminação fecal (Topley & Wilson, 1929; Report 71, 1994).

Devido à alta incidência de contaminação das carcaças, várias pesquisas foram desenvolvidas para diminuir esse tipo de problema. A prática mais comumente empregada para a redução da carga bacteriana de carcaças é a sua lavagem após a evisceração, podendo ser realizada de diversas maneiras. A utilização ou não da água sob pressão, o uso de diferentes temperaturas e a opção pela adição de agentes antimicrobianos são algumas das variantes que permitem taxas diferenciais de efetividade (Tuncan, 1993, Cabedo et al., 1996, Castillo et al., 1998).

O sistema "spray chilling", além de permitir o aumento na velocidade de resfriamento e diminuir a perda evaporativa pelas carcaças, pode ser utilizado em associação com substâncias sanitizantes, como cloro ou ácidos orgânicos de cadeia curta, na busca da redução da carga microbiana contaminante. Dickson (1991) concluiu que ciclos modificados de "spray chilling", intercalando aplicações com ácido acético (0,5, 1,0, e 2,0%) entre os ciclos normais, são medidas efetivas para o controle de bactérias patogênicas em carcaças. Reduções superiores a 3 ciclos logarítmicos foram alcançados na população de *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, em relação ao método testemunha (somente com água).

Outra forma de descontaminação da superfície de carcaças é a pasteurização por vapor, onde o sistema é todo automatizado. As carcaças são expostas a pulsações de vapor de água a 94°C, durante 6 a 8 seg e em seguida são transferidas para câmara de resfriamento que utilizam água com temperaturas inferiores a 5°C (Corry et al., 1995; Cutter et al., 1996).

Em estudo realizado usando uma escala completa em uma instalação de tratamento de carne bovina (Nutsh et al., 1997), a pasteurização com vapor reduziu o nível de contaminação bacteriana de 140 carcaças estudadas. Antes da pasteurização, as carcaças apresentavam uma incidência de contaminação natural por *E. coli* de 16,4% com níveis desde 0,6 até 1,53 log UFC/cm² e os demais microrganismos da família Enterobacteriaceae em uma incidência de

46,4% com níveis de 0,6 até 2,25 log UFC/cm². Após o tratamento, não foi encontrada *E. coli* e a incidência de Enterobacteriaceae foi de 2,9%, com níveis entre 0,6 e 1,99 log UFC/cm².

Em uma comparação entre pasteurização por vapor e outros métodos para reduzir os patógenos nas carcaças de gado, esta promoveu uma redução de patógenos numericamente superior à “toalete” ou à limpeza com água quente/vácuo (Phebus, 1997).

Cabedo *et al.* (1996) estudaram diferentes métodos para redução da contagem bacteriana em carne bovina artificialmente inoculada com *Escherichia coli*. Os 5 tratamentos escolhidos foram: “spray washing” (35°C), “spray washing” (74°C) e “spray washing” (35°C), seguido de enxágüe à baixa pressão com peróxido de hidrogênio (5%), ácido acético (2%) ou fosfato trisódico (12%). O tratamento mais efetivo dentre os realizados foi o “spray washing” (74°C) em todos os tempos de exposição da amostra ao material fecal.

Dorsa (1997) fez uma revisão de técnicas de descontaminação de carcaças que são utilizadas nas indústrias de processamento de carne bovina dos Estados Unidos. Dentre os procedimentos em destaque o autor cita: sistemas de vácuo-vapor, sistemas de lavagem com “spray” (pulverização) e pasteurização a vapor.

Em outro trabalho, realizado por Castillo *et al.* (1998), foi demonstrada a importância do uso da água quente na descontaminação de carcaças artificialmente contaminadas. De um modo geral, a aplicação por pulverização de água aquecida a 97°C durante 5 segundos proporcionou redução nas contagens de *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7, significativamente superior ao tratamento testemunha (apenas lavado com água sem aquecimento).

Várias tecnologias alternativas têm sido estudadas no tratamento de alimentos, assim como novas aplicações das tecnologias existentes para uso nos processos de produção (Bell & Kyriakides, 2000). Os tratamentos com calor úmido, irradiação, ultrafiltração e com luz de intensidade elevada são exemplos destas tecnologias. Evidentemente, a lista de patógenos bacterianos já conhecidos, como *E. coli*, devem ser incluídos em toda consideração sobre as

implicações das associações de novas técnicas para a aplicação de tecnologias alternativas no tratamento dos alimentos.

Este trabalho objetivou realizar um estudo da prevalência de *E. coli* em carcaças de ovinos abatidos em quatro abatedouros com inspeção sanitária estadual. Paralelamente, buscou-se verificar a influência das condições higiênico-sanitárias dos abatedouros e da água de lavagem das carcaças sobre a taxa de isolamento de Coliformes totais, Coliformes fecais e *E. coli* das carcaças e das amostras de água, assim como com a taxa de contagem de mesófilos aeróbios facultativos nessas últimas amostras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas 60 amostras provenientes de carcaças de ovinos abatidos em 4 frigoríficos da cidade de Pelotas – RS, Brasil, com fiscalização sanitária realizada por veterinários da Coordenadoria de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (CISPOA), órgão pertencente a Secretaria Estadual da Agricultura e do Abastecimento (SEAA) do Estado do Rio Grande do Sul.

Em cada visita foram coletadas, também, duas amostras da água utilizada para a lavagem das carcaças, coletando-se assim diretamente da mangueira utilizada nesse procedimento. As amostras de água foram em número de doze: 6 para análise microbiológica e 6 para determinação da concentração de cloro residual.

Das 60 amostras de carcaças, 10 foram do Frigorífico 1 (F1), 10 do Frigorífico 2 (F2), 30 do Frigorífico 3 (F3) e 10 do Frigorífico 4 (F4). As amostras das superfícies das carcaças foram coletadas através de *swabs*, em uma solução de 25 mL de água peptonada¹ a 0,1%. Os *swabs* foram coletados em 5 regiões da carcaça (FIGURA 1), com 25 cm² cada, totalizando 125 cm² de área amostrada por carcaça. Dessa maneira, cada mL correspondia uma região de 5 cm² da

¹ Bacto Peptone - DIFCO

carça. As regiões de coleta foram: pescoço, paleta, costela, flanco e quarto posterior, como demonstra a FIGURA 1. Todas as amostras de carcaças foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e transportadas ao laboratório em, no máximo, 5 h para o início das devidas análises microbiológicas.



FIGURA 1: Localização dos pontos de coleta de amostra superficial nas carcaças

Metodologia

Para o estudo da prevalência de *Escherichia coli* enteropatogênica em carcaças de ovinos abatidos em frigoríficos sob inspeção estadual, foram selecionados 4 frigoríficos que abatiam, freqüentemente, essa espécie animal.

Coletaram-se, em cada visita, 10 amostras da superfície de carcaças e preencheu-se um questionário (ANEXO 1) com perguntas relacionadas às condições de instalação do prédio, à higiene na linha de abate, aos funcionários e às práticas de manejo ao longo da linha de matança. Este questionário e os dados foram computados no programa Epi Info Versão 6.04 (Deam *et al.*, 1994) a fim de se correlacionar os dados epidemiológicos com os resultados das análises

microbiológicas. Foi usado o χ^2 de Mantel-Haenzsel para tendência linear e “odds ratio” (OR) no intervalo de confiança de 95%.

Para avaliar a ação descontaminante da água de lavagem das carcaças, foram feitas coletas a cada dia de amostragem. A água coletada foi submetida à dosagem de cloro residual, à contagem de mesófilos aeróbios facultativos (MA) em placa de Petri contendo *Plate Count Agar*¹, utilizando-se a técnica do *pour-plate* e contagem de Coliformes fecais de acordo com American Public Health Association Water and Wastewater (1985). A contagem de *Escherichia coli* foi conduzida pelo método do Número Mais Provável (NMP) série de três tubos (Brasil, 1993) e confirmação bioquímica pelo método IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato). A determinação da concentração de cloro residual foi realizada através da técnica do iodeto amido conforme descrito pela American Public Health Association (APHA, 1992b).

As análises da superfície das carcaças compreenderam a contagem de *Escherichia coli* pela metodologia tradicional (NMP) e confirmação através da série bioquímica IMViC. Também foram semeadas em placas PetrifilmTM EC da 3M, utilizadas de acordo com o descrito pelo fabricante.

Após a confirmação de *E. coli* nas amostras, essas foram conservadas em Ágar Conservação (ANEXO 2), de onde foram coletadas para os demais testes.

Como método alternativo de conservação, as cepas foram inoculadas em tubos tipo *ependorf* com 800 μ L de *Tryptone Soya Broth* (TSB)² e incubadas em estufas a 35°C durante 24 h. Posteriormente, foi adicionado 15% (120 μ L) de glicerina estéril para evitar o rompimento das células por ação dos cristais de gelo formados durante o congelamento e os tubos foram acondicionados em *freezer* a -20°C.

A análise estatística para verificar se existiam diferenças significativas entre as médias das amostras de carcaça dos frigoríficos abatedouros analisados foi realizada conforme as recomendações de Book (1977) e Vieira (1999). Os

¹ Bacto Peptone – DIFCO

² OXOID, England

resultados foram transformados em unidades logarítmicas, sendo realizada uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tuckey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vanderlinde *et al.* (1999) demonstraram a presença de microrganismos indicadores de contaminação por material fecal, como *E. coli*, em níveis de até 75% das carcaças ovinas amostradas na Austrália. Em nosso estudo, esse índice foi maior, obtendo-se um resultado de 93,3% (56/60) das carcaças contaminadas com *E. coli*. Individualmente, as médias de carcaças com a presença de *E. coli* nos frigoríficos foi de 100% para o F1 e para o F2, 90% (27/30) para o F3, assim como para o F4 (9/10).

A média de CF nas 60 amostras de carcaças foi de 2,3 NMP/cm², sendo que o F1 apresentou contagem média de 3,65, o F2 contagem média de 3,44, o F3 de 1,37 e o F4 de 0,73 NMP/cm². A média de *E. coli* entre as carcaças dos 4 frigoríficos foi de 1,47 NMP/cm², sendo 2,21 para o F1, 2,25 para o F2, 0,77 para o F3 e 0,65 NMP/cm² para o F4.

Na avaliação do cloro residual das amostras de água, naquela proveniente do F1 não foi encontrado cloro. Nos F2, F3 e F4 encontrou-se resultados de 0,9, 1,42 e 1,05 mgCl⁻¹.L⁻¹, respectivamente. Os resultados das análises microbiológicas e de cloro residual encontrados nas amostras de carcaças e de água usada para a lavagem dessas estão ilustrados na Figura 2. Para melhor compreensão dos dados, os valores estão expressos de forma não-logaritimizada em tabela no ANEXO 3.

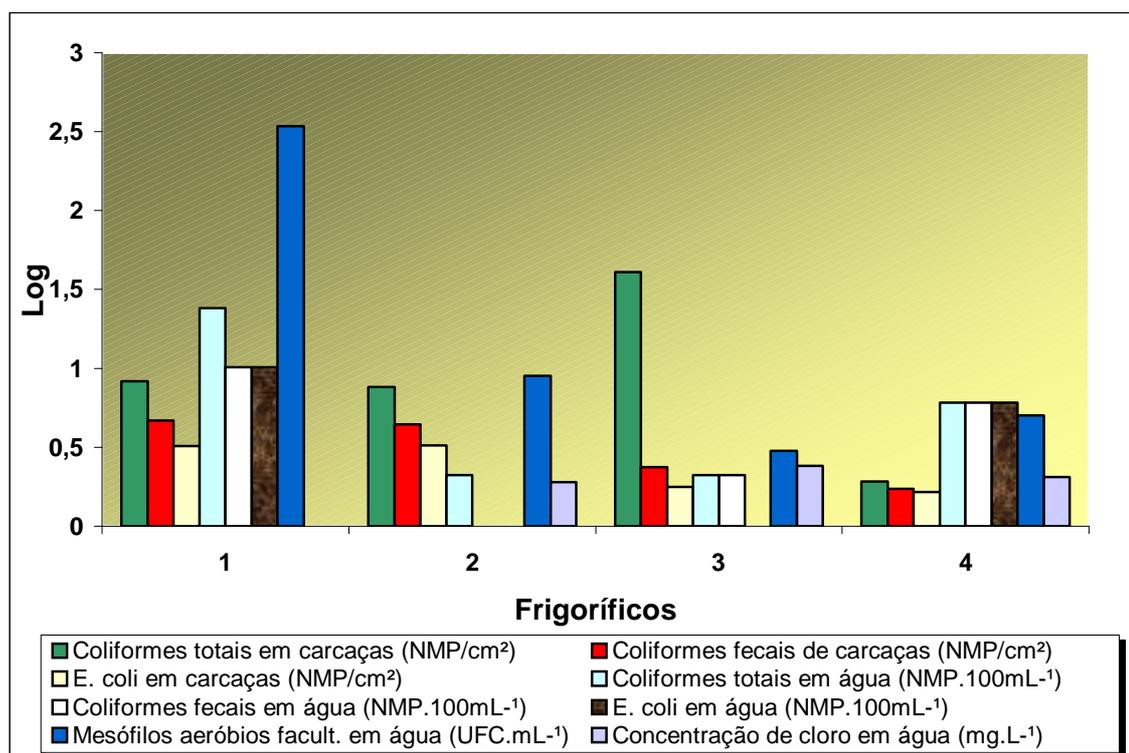


FIGURA 2: Média da contagem de microrganismos nas carcaças, na água usada para lavagem e da concentração de cloro na água de lavagem das carcaças nos frigoríficos 1,2,3 e 4.

Nas análises microbiológicas de água, observou-se que a média encontrada entre os frigoríficos para a enumeração de Coliformes totais (CT) foi de 7,57, de CF 3,85 e de *E. coli* foi de 3,54 NMP.100mL⁻¹. Para mesófilos aeróbios facultativos, encontrou-se uma média de 89,25 UFC.mL⁻¹, com 343, 8, 2, e 4 UFC.mL⁻¹ para o F1, o F2, o F3 e o F4, respectivamente.

O F1 apresentou 23 NMP.100mL⁻¹ de CT na água de lavagem da carcaça; o F2 1,1; o F3 1,1 e o F4 5,1 NMP.100mL⁻¹. Na enumeração de CF o F1 obteve 9,2, o F2 0; o F3 1,1 e o F4 5,1 NMP.100mL⁻¹. Já na contagem de *E. coli*, apenas nas amostras dos F1 e F4 houve presença do microrganismo na água, com 9,2 e 5,1 NMP.100mL⁻¹, respectivamente.

Parece que alguns microrganismos, como no caso do grupo de CT, respondem de forma diferente à cloração, já que no F3, onde a concentração de

cloro residual na água utilizada para lavagem das carcaças foi a mais alta, a contagem desse grupo também foi alta, enquanto esperava-se o contrário.

Fazendo-se uma análise das médias de enumeração dos microrganismos nas carcaças, a contagem de CT do F4 foi a mais baixa, entretanto apresentou alta contagem de *E. coli*. Já o F3 apresentou alta enumeração de CT (39,85 NMP/cm²) mas baixa contagem de *E. coli* (0,77 NMP/cm²). A fonte de contaminação por *E. coli* nas carcaças do F4 pode ser a água de lavagem, já que foi isolado esse microrganismo na água.

Aplicando-se análise de variância (ANOVA) para verificar se houve diferenças significativas entre os resultados das médias de enumeração dos microrganismos nas amostras de carcaças dos frigoríficos, verificou-se que para CT, não existiram diferenças significativas entre os frigoríficos ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Já para a enumeração de CF, houve diferenças significativas entre as médias de enumeração dos abatedouros. Aplicando-se o teste de Tuckey, verificou-se que a contagem de CF foi significativamente maior no F2 em relação ao F3 e ao F4, assim como no F1 também foi significativamente maior que no F3 e no F4. Não foram encontradas diferenças significativas entre o F1 e o F2 e entre o F3 e o F4 com relação a enumeração de CF.

Para a média de enumeração de *E. coli* nas amostras de carcaças dos frigoríficos, houve diferenças significativas apenas entre os frigoríficos F2 e F4. A média da contagem do microrganismo no F2 foi significativamente maior que no F4, e não foram verificadas diferenças significativas entre o F1 e o F2, entre o F1 e o F3, entre o F2 e o F3 nem entre o F3 e o F4.

Analisando-se a interferência da concentração de cloro sobre a enumeração de microrganismos na água de lavagem das carcaças, observou-se que houve uma correlação negativa elevada (FIGURA 3 - A) entre a concentração de cloro e Mesófilos aeróbios facultativos (MA), com $r = -0,96$. A correlação também foi negativa entre a concentração de cloro e CT (FIGURA 3 - B), apresentando um $r = -0,77$, porém menor do que quando comparada à correlação entre cloro e MA. Essa correlação negativa significa que quanto maior a concentração de cloro na água, menor a enumeração de MA e de CT (correlação

inversamente proporcional), o que pode ser constatado na Figura 2, onde o F1 não apresentou Cl^- na água de lavagem e obteve maior contaminação por MA, e nas carcaças, por CT, CF e *E.coli*.

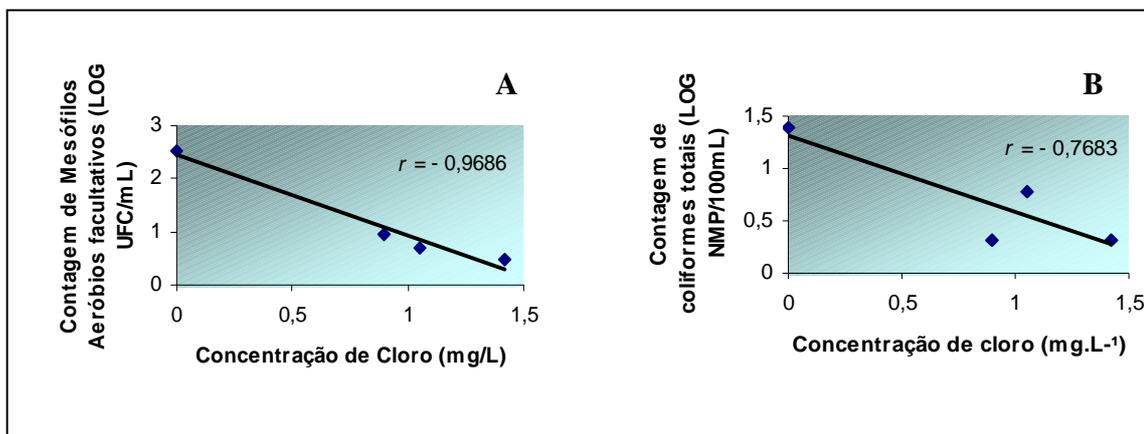


FIGURA 3: Diagrama de dispersão para coeficiente de correlação entre concentração de cloro na água de lavagem das carcaças e a enumeração de mesófilos aeróbios facultativos (A) e entre a concentração de cloro na água e a enumeração de Coliformes totais (B).

Das amostras de carcaça e de água, foram obtidos 176 isolados de *E. coli*, distribuídas como demonstrado na TABELA 1. Podemos observar que a amostra da **água de lavagem** de carcaça do F1 não apresentou contagem de cloro residual e obteve maior contagem de mesófilos aeróbios facultativos (343 UFC.mL⁻¹), de CF (9,2 NMP.100mL⁻¹) e de *E. coli* (9,2 NMP.100mL⁻¹). De acordo com o questionário epidemiológico aplicado, a água que abastecia o frigorífico era proveniente de poço artesiano, localizado a pelo menos 45 m das fontes de contaminação, porém não era rebocado por fora e nem possuía tampa. Estas últimas duas características poderiam estar contribuindo para a alta contagem de microrganismos de origem fecal, provavelmente proveniente de pássaros ou de infiltrações no poço. Foi relatado que a água era clorada antes de ser distribuída para o interior do frigorífico. A ausência de cloro residual sugere a falta de

cloração da água, a utilização de cloro fora do prazo de validade ou a degradação do princípio-ativo pela alta concentração de bactérias presentes na água.

TABELA 1: Número de amostras (carcaças e água) e de isolados de *E. coli* isoladas em 4 frigoríficos de Pelotas - RS

Frigorífico	Nº amostras	Nº cepas de <i>E. coli</i> (nº)
F1	10	42
F2	10	30
F3	30	80
F4	10	19
A1	1	5
A2	1	0
A3	3	0
A4	1	4
Total	66	176

F1 = Frigorífico 1; F2 = Frigorífico 2; F3 = Frigorífico 3; F4 = Frigorífico 4 ;A 1 = água de lavagem de carcaça do Frigorífico 1; A2 = água de lavagem de carcaça do Frigorífico 2; A3 = água de lavagem de carcaça do Frigorífico 3; A4 = água de lavagem de carcaça do Frigorífico 4.

Nos frigoríficos 2 e 3 não observou-se presença de *E. coli* em suas amostras de água, as quais apresentaram concentrações de cloro de 0,90 e 1,42 mg.mL⁻¹, respectivamente.

O F1 também foi o que apresentava pior **aspecto de limpeza do piso** na sala de abate, seguido do F2. A contagem de MA na água do F1 foi alta em relação aos outros frigoríficos, mas encontrou-se dentro dos parâmetros aceitáveis para a potabilidade de água, segundo a atual legislação (até 500 UFC.mL⁻¹, segundo Portaria nº 1469 de 29/12/2000, do Ministério da Saúde). Entretanto, a limpeza do ambiente pode contribuir para a disseminação de microrganismos que, inevitavelmente, alcançariam as carcaças. As médias da enumeração de CF e *E. coli* nas carcaças desses frigoríficos foram as mais altas em comparação à média dos outros dois frigoríficos.

Quanto ao **piso na sala de abate**, houve uma variação de 40, 60 e 80% de **integridade**. O F3, que teve maior enumeração média de CT (39,85 NMP/cm²), apresentou 40% de integridade, seguido dos frigoríficos 1 (7,26 NMP/cm²) e do 4

(0,92 NMP/cm²), com 60% de integridade. O F2, que possuía 80% de integridade do piso, apresentou 6,73 NMP/cm² de CT.

A possibilidade de **acesso de outros animais ao interior do abatedouro, que não os destinados ao abate**, apresentou correlação com a enumeração de CF e *E. coli*, pois no Frigorífico onde era possível a entrada de outros animais (F1), a média da enumeração de CF nas carcaças foi a mais alta (3,65 NMP/cm²) e a de *E. coli* foi a segunda mais alta (2,21 NMP/cm²) entre os 4 frigoríficos. Bell & Kyriakides (2000) afirmaram que locais onde se abatem bovinos juntamente com outras espécies de animais, requerem procedimentos de limpeza entre os abates das diferentes espécies.

Surpreendentemente, o frigorífico em que apresentou **rupturas nas telas** localizadas nas aberturas, foi o que obteve menor média de CT (0,92 NMP/cm²), CF (0,73 NMP/cm²) e de *E. coli* (0,65 NMP/cm²) nas carcaças.

O único frigorífico que não utilizava **pressão na água para a lavagem das carcaças** era o F4, pois a bomba de pressão estava com defeitos no dia da coleta. A média da enumeração de CT (0,92 NMP/cm²), de CF (0,73 NMP/cm²) e de *E. coli* (0,65 NMP/cm²) nas carcaças foi a menor, comparando-se com os resultados das médias encontradas nos outros frigoríficos. Esses resultados corroboram a tese de Bell & Kyriakides (2000), que afirmaram que o uso da lavagem da carcaça com água sob alta pressão não é a mais indicada por produzir formação de aerossóis e que o correto seria a retirada, por excisão, de toda a contaminação fecal ou de terra com auxílio de facas. Entretanto, nesse caso não é possível afirmar que a causa da baixa contaminação seja da falta de pressão na água, podendo haver outros fatores contribuindo com esses resultados.

Quanto ao **escoamento da água de lavagem de mãos e botas**, possivelmente pode ter influenciado a enumeração de CF e de *E. coli* nas carcaças. No F1 e no F2, essa água de lavagem escoava diretamente para o piso onde os funcionários realizavam a higienização, diferentemente do F3 e do F4, onde havia escoamento para o sistema de esgoto. Verificou-se que a contagem destes microrganismos no F1 e no F2 foram as mais altas e não diferiram

estatisticamente entre si: 3,65 NMP/cm² de CF e 2,21 NMP/cm² de *E. coli* no F1 e 3,44 NMP/cm² de CF e 2,25 NMP/cm² no F2. Os coliformes fecais poderiam estar sendo eliminados das mãos e botas no momento da higienização, porém, através da água que escorria livremente no piso, havia possibilidade de se aderirem novamente às botas dos funcionários, existindo a viabilidade da introdução desses microrganismos no abatedouro através dos calçados dos trabalhadores.

As **paredes com cantos arredondados** são indicadas para facilitar a limpeza do local, evitando assim o acúmulo de sujeira. Nesse estudo, os frigoríficos 1 e 2 não possuíam paredes com cantos arredondados e tiveram as maiores médias de contagem de CF e de *E. coli* nas carcaças, como citado anteriormente. Porém, essa verificação baseia-se apenas em aspectos observacionais, já que esses resultados não foram avaliados diretamente, como no caso de se coletar amostras dos cantos das paredes.

Sistema de fluxo linear numa linha de abate é aquele em que as carcaças seguem um fluxo contínuo pelas diferentes etapas na sala de abate, seguindo sempre em frente. O F1 não possuía esse sistema, ocorrendo um retorno da carcaça ao local da área suja, o que pode interferir na qualidade da carcaça. Esse frigorífico foi o que apresentou maior média de enumeração de CF (3,65 NMP/cm²) e a 2^a maior de *E. coli* (2,21 NMP/cm²) nas carcaças, ressaltando a importância de um fluxo correto dentro da sala de abate.

Coincidentemente ou não, a média de enumeração de *E. coli* no F2 foi a mais alta (2,25 NMP/cm²) e esse frigorífico não possuía **separação da área suja e da área limpa**, porém essa diferença não foi significativa, comparando-se com o resultado do F1.

Quanto a contaminação proveniente dos animais, Pennington (1997) descreveu que a introdução de um esquema de incentivo ao pagamento para a venda de animais limpos para o abate tem sido proposto para diminuir a contaminação natural visível na propriedade rural e durante o transporte. A limpeza eficaz e os elevados padrões de higiene dos veículos usados para o transporte são elementos fundamentais na prevenção da difundida contaminação cruzada nos envios de animais (Bell & Kyriakides, 2000).

A análise dos dados de **lavagem de mãos pelos funcionários antes de entrar no abatedouro** mostrou interferências diferentes sobre a média da enumeração dos microrganismos, nos 4 frigoríficos (TABELA 2). O F3 era aquele em que a menor porcentagem de funcionários lavavam as mãos (5%) e justamente foi o que apresentou média mais alta de Coliformes totais, os quais são o principal grupo de bactérias presente em más condições higiênicas. No F1 e no F2, cerca de 30% dos funcionários realizavam essa prática antes de iniciar as atividades. No F1, a contagem de CF foi a mais alta e no F2 a de enumeração de *E. coli*. O F4 possuía a maior porcentagem de funcionários que lavavam as mãos antes de entrar na planta de abate: cerca de 50% dos trabalhadores e foi o que obteve menores contagens bacterianas. Parece que esse ato contribui para a diminuição da contaminação microbiana das carcaças, pois o F4 obteve as menores contagens.

TABELA 2: Porcentagem de funcionários que lavavam as mãos antes de entrar na sala de abate (no dia da amostragem) e enumeração média de CT, CF e *E. coli* das carcaças em 4 frigoríficos de Pelotas - RS

Frigorífico	% lavagem mãos	CT (NMP/cm ²)	CF (NMP/cm ²)	<i>E. coli</i> (NMP/cm ²)
F1	30	7,26	3,65	2,21
F2	30	6,73	3,44	2,25
F3	5	39,85	1,37	0,77
F4	50	0,92	0,73	0,65

CT = Coliformes totais; CF = Coliformes fecais

4. CONCLUSÕES

A média de contaminação por *E. coli* nas carcaças de ovinos abatidos em 4 frigoríficos analisados foi alta (93,3%).

Aspectos ligados à deficiência no processo geral de higiene nos frigoríficos, incluídos nas Boas Práticas de Fabricação, possivelmente tenham relação com as maiores contagens vistas.

A concentração de cloro na água de lavagem das carcaças é inversamente proporcional à enumeração de microrganismos na água e de *E. coli* nas carcaças.

CAPÍTULO 2

COMPARAÇÃO ENTRE PETRIFILM™ EC E METODOLOGIA TRADICIONAL PARA A ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *E. coli* EM CARÇAÇAS DE OVINOS

1. INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos, o controle microbiológico dos processos e do produto final é uma exigência sanitária e garantia da qualidade de seus produtos. Para verificar Pontos Críticos de Controle (PCCs) ou mesmo lotes de produtos, os importadores exigem agilidade e confiança nos resultados apresentados.

Escherichia coli é uma bactéria aeróbia facultativa, fermentadora de lactose com formação de ácido e gás, tanto em aerobiose como em anaerobiose. Todas as cepas reduzem o nitrato a nitrito, sendo oxidase-negativa e catalase-positiva. Atualmente, além destas, outras características bioquímicas têm sido exploradas em meios seletivos e métodos de detecção, como a produção de β -glucuronidase,

utilizada em uma série de meios cromogênicos e fluorogênicos (formam fluoresceína sob luz ultravioleta). Esses testes, juntamente com a prova de produção de indol, permitem confirmar a presença de *E. coli* (Bell e Kyriakides, 2000).

As principais características bioquímicas e morfológicas são demonstradas na tabela a seguir:

TABELA 1: Algumas características bioquímicas e morfológicas de *E. coli**

Característica	Reação
Gram	Negativa
Morfologia celular	Bacilo reto não formador de esporo 1,1 x 1,5 x 2,0-6,0 µm
Motilidade	variável
Crescimento aeróbio	+
Crescimento anaeróbio	+
Temperatura ótima de crescimento	37°C
Catalase	+
Oxidase	-
Lactose a 37°C	≥ 90% +
Lactose a 44°C	≥ 90% +
Indol a 37°C	≥ 90% +
Indol a 44°C	≥ 90% +
Reação do vermelho de Metila	≥ 90% +
Reação do Voges-Proskauer	≥ 90% -
Utilização de citrato	≥ 90% -
H ₂ S no meio TSI**	≥ 90% -

* adaptada de Ørskov, 1984.

** triple sugar iron

O gênero *Escherichia* está presente na microbiota intestinal de animais e humanos, sendo, assim, utilizado como indicador de contaminação fecal no processamento de alimentos. Sua detecção pode evidenciar falhas no procedimento higiênico-sanitário da indústria, representando risco aos consumidores, já que algumas linhagens apresentam potencial patogênico por produzirem toxinas e/ou invasão de células entéricas através do fenômeno de

adesão. As lesões histológicas foram observadas pela primeira vez em suínos, com a designação *Attachment/Effacement* ou lesão A/E (Campos & Trabulsi, 1999).

A metodologia do número mais provável (NMP) geralmente é a metodologia padrão para a enumeração de *E. coli* em alimentos. O método NMP é extremamente enfadonho e tedioso (requer muitas repicagens), demorado (5 a 8 dias) e caro em termos de mão-de-obra e materiais (Hitchens *et al.*, 1992).

Stier (1993) comenta que os métodos rápidos para detecção de microrganismos estão entre as ferramentas mais valiosas para as companhias que estão implementando o plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) ou também para as que já o implementaram. As aplicações potenciais e reais dessas tecnologias incluem a avaliação do grau de risco que representam os ingredientes, o sistema de processamento e a planta, a definição de limites para o desenvolvimento dos Pontos de Controle Críticos (PCCs), algum monitoramento, medidas preventivas, registros, avaliação dos desvios e verificação de que o sistema está funcionando como previsto. Os métodos rápidos podem também ser usados pela equipe APPCC para avaliar qualquer mudança ou sugestão de mudança para o sistema.

A comparação da metodologia tradicional com a metodologia rápida de detecção de *Escherichia coli* em placas Petrifilm™ EC serviria para verificar se os dois métodos se equivalem quanto a enumeração desse microrganismo em amostras superficiais de carcaças de ovinos, pois sabe-se que a matriz alimentícia apresenta efeito sobre os resultados (especificidade e sensibilidade) apresentados por esse método. Essa comprovação enriquece a validação desse tipo de método rápido para uso confiável em análises de rotina em nível de indústria.

Por essa razão, buscou-se comparar o método padrão Número Mais Provável (NMP) série de três tubos com o Petrifilm™ EC da 3M.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizadas amostras provenientes da superfície de carcaças de ovinos oriundas de 4 diferentes frigoríficos, todos com fiscalização sanitária realizada pelo CISPOA. Foram analisadas um total de 60 amostras, sendo 10 do F1, 10 do F2, 30 do F3 e 10 do F4. As amostras foram coletadas em uma solução de 25 mL de água peptonada a 0,1%, onde foram imersos os *swabs*. Cada mL correspondia a uma região de 5 cm² da carcaça, pois foram coletadas através de *swabs* de 5 regiões da carcaça, cada uma com 25 cm², totalizando 125 cm².

Metodologia

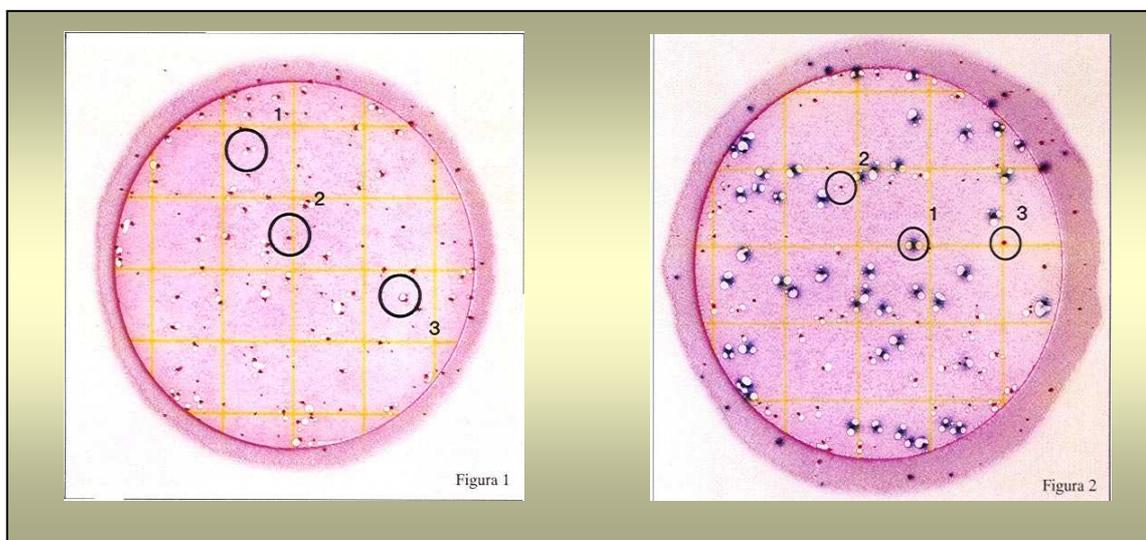
A) Metodologia Tradicional

A técnica empregada foi a do Número Mais Provável (NMP), série de três tubos (Brasil, 1993) e confirmação de *E. coli* através da série bioquímica IMViC.

B) Placas Petrifilm™ EC

As amostras foram inoculadas nas placas Petrifilm™ EC para a contagem de Coliformes totais (CT) e de *E. coli*. Conforme indicação do fabricante, foi adicionado 1 mL da amostra diretamente sobre o meio de cultura desidratado existente no filme teste. Logo em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 35°C durante 24 h para a contagem das colônias de CT e 48 h para as de *E. coli*.

As placas Petrifilm™ EC contém Bile Vermelho Violeta, uma substância solúvel em água que gelatiniza quando hidratada; um indicador da atividade da β-glucuronidase (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucuronide) (BCIG) e o indicador tetrazolium, que facilita a identificação das colônias. A maioria das *E. coli* (cerca de 97%) apresenta atividade da β-glucuronidase que produz, neste teste, um precipitado azul associado à colônia (Figura 1). A produção de gás visualizada e aprisionada no filme é produzida pela fermentação da lactose pelos coliformes e *E. coli*.



À esquerda: placa com colônias características de Coliformes totais: 1 = colônia de CT com bolha de gás, 2 = provável detrito alimentar pois não há produção de gás, 3 = colônia de CT dividida pela bolha de gás; **À direita:** placa com colônias de CT e de *E. coli*: 1 = colônia de *E. coli* de cor azulada, com produção de gás, 2 = colônia de CT, 3 = detrito alimentar.

Fonte: Manual da 3M de utilização das Placas Petrifilm™ EC.

FIGURA 1: Placas Petrifilm™ EC.

Os coliformes que crescem no Petrifilm™ EC produzem ácido, fazendo com que o indicador de pH altere a cor do gel para um vermelho escuro. O gás, aprisionado ao redor das colônias vermelhas de coliformes, confirma esse grupo de bactérias. Esse teste não é usado para a detecção do sorogrupo O157, já que o princípio da identificação é a reação da enzima β -glucuronidase ao corante, enzima essa que esse sorogrupo não possui.

Os valores foram convertidos para \log_{10}/cm^2 , sendo realizada comparação de médias através do teste “t” de Student e através de análise de regressão, baseada na determinação do coeficiente de correlação (r) entre as metodologias. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme as recomendações de Book (1997) e Vieira (1999), utilizando o software Statistica for windows 5.1.

Copyright© StatSoft, Inc.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando-se a técnica tradicional (NMP), obteve-se contagem média de CT e de *E. coli* de 13,69 NMP/cm² e 0,67 NMP/cm², respectivamente. No Petrifilm™, as médias obtidas foram de 2,19 UFC/cm² para CT e 1,07 UFC/cm² para *E. coli* (Tabela 1). Os resultados das amostras de carcaças pela metodologia tradicional e pelo Petrifilm™ estão listados no ANEXO 4.

TABELA 1: Estatística descritiva e coeficiente de correlação de Coliformes totais e de *E. coli* pela metodologia Número Mais Provável (NMP) série de três tubos e pelo Petrifilm™ EC em 60 amostras de superfície de carcaças de ovinos

	μ	σ	σ^2	CV
CT ^a	13,69	47,96	2300	350,32
CT ^b	2,19	2,02	4,11	92,24
EC ^a	0,67	0,97	0,95	144,77
EC ^b	1,07	1,65	2,75	154,2
CT ^c	1,15	1,26	1,59	109,56
CT ^d	0,98	0,59	0,35	60,20
EC ^c	0,41	0,42	0,17	102,44
EC ^d	0,54	0,55	0,31	101,85

Nota: μ = Média; σ = Desvio Padrão; σ^2 = Variância; CV = Coeficiente de variação (%); CT= coliformes totais ; EC = *Escherichia coli*.

^a Método do Número Mais Provável em NMP/cm²

^b Petrifilm™ em UFC/cm²

^c Método do Número Mais Provável em Log NMP/cm²

^d Petrifilm™ em Log UFC/cm²

Se utilizarmos como referência os padrões descritos pela Food Security Inspection Service (USDA-FSIS, 1996b), empregado para amostras de carcaças de bovinos, o resultado da média de *E. coli* nas 60 carcaças ficou dentro da “classe marginal”, tanto no NMP (0,67 NMP/cm²), quanto no Petrifilm™ (1,07 UFC/cm²) com contagem menor ou igual a 100 UFC/cm² (Tabela 1), que

determina essa classificação para amostras de carcaças bovinas. Nesse caso, o FSIS indicaria revisão dos controles de processos dentro dos frigoríficos analisados.

A comparação de métodos realizada neste trabalho é justificada pelo fato que a utilização de métodos com maior especificidade, sensibilidade, precisão e rapidez na determinação quantitativa de coliformes possui grande relevância dentro da avaliação higiênico-sanitária de processos e de produtos alimentícios.

Para a verificação dos resultados do método NMP, utilizou-se uma tabela (BAM, 1998) que fornece os limites máximo e mínimo do número de bactérias presentes em uma amostra e o resultado é baseado em um número provável, compreendido em um grande intervalo de confiança entre o menor e o maior número. O número efetivo de bactérias pode ser qualquer um entre estes dois limites, o que pode ter interferido na comparação entre as duas metodologias, já que o Petrifilm™ considera o número real de colônias capazes de serem visualizadas, tornando-o, portanto, mais preciso.

Em um trabalho semelhante, Townsend et al. (1998) compararam a técnica do *SimPlate* com a técnica do Número Mais Provável (NMP) série de três tubos, Ágar bile vermelho violeta (VRBA) + MUG e o Petrifilm™, para a quantificação de coliformes em amostras de diversos alimentos. Os dados da análise de regressão do *SimPlate* versus Petrifilm™ geraram um coeficiente de correlação elevado ($r = 0,89$) para coliformes totais, e o coeficiente de correlação obtido entre *SimPlate* e VRBA + MUG também foi elevado ($r = 0,90$). Entretanto, os autores não relatam o índice de correlação entre as metodologias rápidas testadas e o NMP. Mesmo não relatando a correlação Petrifilm™ versus NMP, os autores citam que o Petrifilm™ apresenta sensibilidade e poder de detecção igual ou maior aos outros métodos, fato que diverge dos resultados encontrados neste trabalho.

Na comparação das médias dos dados da análise de coliformes totais através do teste “t”, verificou-se que a metodologia tradicional apresentou, em média, contagem de coliformes totais significativamente superior ($p < 0,05$) ao Petrifilm™. Esta diferença foi comprovada através do baixo coeficiente de correlação (r) entre os métodos ($r = 0,27$), como é mostrado na Figura 1.

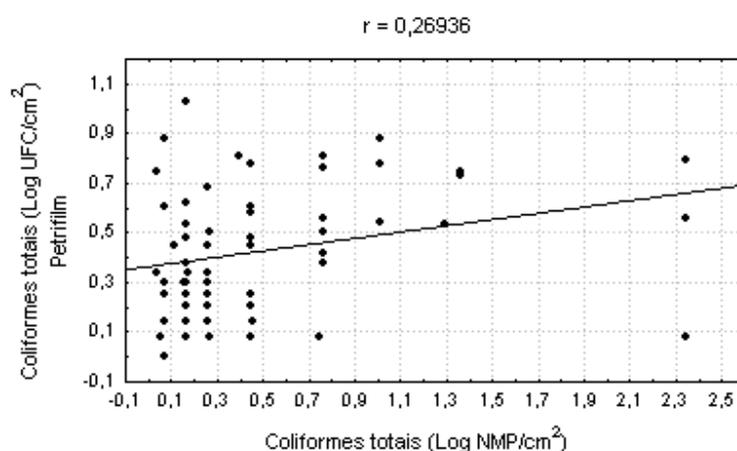


Figura 1: Diagrama de dispersão e coeficiente de correlação entre a contagem de coliformes totais pela metodologia tradicional (Número Mais Provável – NMP, série de três tubos) e pelo Petrifilm™.

No entanto, ao compararmos as médias dos resultados de *E. coli*, o NMP apresentou valor médio menor ($p < 0,05$) do que o Petrifilm™, com baixo coeficiente de correlação ($r = 0,56$) entre os métodos, como é mostrado na Figura 2.

Russel (2000) comparou a metodologia do NMP com outros métodos comumente utilizados nos Estados Unidos, como Petrifilm™, *SimPlate*, *BioSys optical* e *Bactometer conductance*. O coeficiente de correlação para as linhas de regressão, comparando-se a metodologia padrão NMP com o método Petrifilm™ para *E. coli*, foi de 0,95 e 0,93 para as amostras de frango e de carne moída, respectivamente, contrapondo-se aos resultados encontrados neste trabalho, onde o coeficiente de correlação (r) foi de 0,56. O autor ressalta, entretanto, que em amostras com concentrações de *E. coli* muito altas ou muito baixas, o método Petrifilm™ é menos indicado pois torna-se pouco sensível para a identificação do microrganismo. Townsend *et al.* (1998) também relataram que quando os níveis

de contaminação das amostras forem muito baixos ou muito elevados, o Petrifilm™ não é o método indicado.

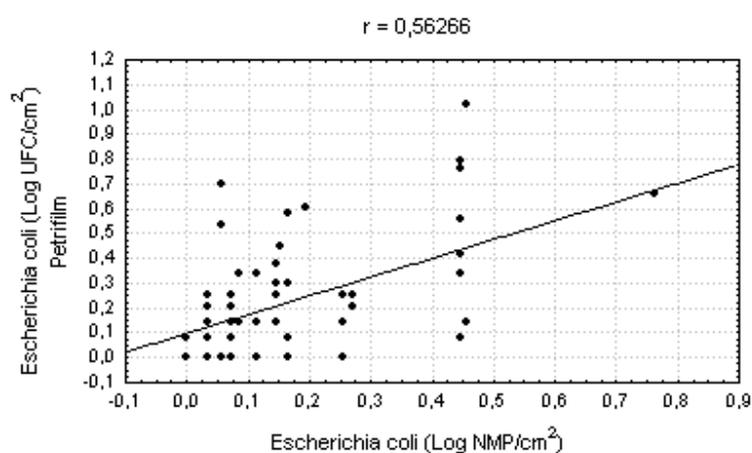


Figura 2: Diagrama de dispersão e coeficiente de correlação entre a contagem de *Escherichia coli* pela metodologia tradicional (Número Mais Provável – NMP, série de três tubos) e pelo Petrifilm™.

Segundo Campos e Trabulsi (1999) e Silva *et al.* (1997), os meios líquidos são mais apropriados para amostras com concentrações bacterianas limites (muito elevadas ou muito reduzidas) ou quando o volume de material a ser semeado for grande. Estas afirmações ressaltam, novamente, a idéia que a concentração bacteriana presente nas amostras pode ter sido um fator determinante para a baixa correlação e para os melhores resultados obtidos através do NMP. Neste estudo, a concentração de CT em média, nas amostras, foi baixa (Tabela 1), provavelmente fazendo com que o método NMP apresentasse maior sensibilidade, tendo em vista que o limite de detecção do Petrifilm™ é de 10 UFC.mL⁻¹

Para Cecchi (1999), a confiabilidade dos resultados em um método analítico, depende de vários fatores como precisão e sensibilidade. Para a autora,

a precisão de um método é determinada pela variação entre resultados obtidos, sendo expressa através de medidas de estatística descritiva como o desvio padrão, a variância e o coeficiente de variação, onde a precisão é inversamente proporcional a estas medidas estatísticas. De acordo com os resultados dos desvios padrões, variâncias e coeficientes de variação encontrados para CT pelos métodos do NMP e Petrifilm™, pode-se inferir que o primeiro apresentou menor precisão, pela elevada variação entre os resultados obtidos, quando comparado ao segundo, pois a dispersão dos resultados pelo NMP foi praticamente quatro vezes maior que a apresentada pelo Petrifilm™ (Tabela 1). Já para a enumeração de *E. coli*, foram verificados coeficientes de variação próximos, o que diferentemente da análise de CT, demonstrou que os métodos apresentavam precisão semelhante para análise deste microrganismo neste tipo de amostra (Tabela 1).

Da mesma forma, Cecchi (1999) define sensibilidade como a menor quantidade de um componente que se consegue medir em uma análise, ou seja, o maior poder de medida ou leitura de um método. Nas amostras com menor concentração microbiana, detectou-se um número maior de CT pelo NMP do que pelo método Petrifilm™, denotando maior sensibilidade pela primeira metodologia. De outra forma, na enumeração de *E. coli*, o método Petrifilm™ foi o que apresentou maior sensibilidade.

4. CONCLUSÕES

A correlação entre os métodos testados (NMP x Petrifilm™) foi baixa, tanto para coliformes totais quanto para *E. coli*, com a metodologia tradicional (NMP) apresentando maior sensibilidade na enumeração de coliformes totais em amostras com concentração microbiana inicial baixa, enquanto que o método Petrifilm™ apresentou maior sensibilidade para enumeração de *E. coli*.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DE SOROGRUPOS DE *E. coli* E DE CEPAS PRODUTORAS DE VEROTOXINA

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Escherichia coli* compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra os três antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, os antígenos (AG) O, K e H (Campos & Trabulsi, 1999). Atualmente são conhecidos 174 AG O, 100 AG K e 57 AG H que, internacionalmente, são designados por números arábicos, colocados em seguida a cada letra, como, por exemplo, O26 K60 H11.

Nem todas as cepas do microrganismo são rugosas, ou seja, não apresentam o AG O. Além disso, muitas não possuem o AG K e outras não apresentam motilidade, estando ausente o AG flagelar (H).

Escherichia coli enteropatogênica pode ser dividida em 5 categorias, segundo Ormenese *et al.* (1999), baseadas na virulência, nas síndromes clínicas, nas diferenças de epidemiologia e dos sorotipos O:H. Essas categorias são: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC),

E. coli enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Escherichia coli enteropatogênica clássica (EPEC) pode estar presente em adultos, com rara apresentação de sintomas. Acomete principalmente crianças, sendo associada à diarreia infantil e dos recém-nascidos. Segundo Campos & Trabulsi (1999), este sorogrupo tem sido encontrado em torno de 30% de crianças com até um ano de idade, que apresentam diarreia aguda endêmica na cidade de São Paulo, com maior frequência e gravidade nas que não se alimentam de leite materno. Seu reservatório parece ser o homem e em hospitais e berçários, geralmente é transmitida por contato pessoal, sendo que crianças com diarreia representam a principal fonte de infecção.

A virulência da EPEC está associada com a capacidade de adesão à mucosa do intestino e à destruição das microvilosidades das células epiteliais intestinais. A adesão é mediada por um plasmídeo EAF (EPEC adherence factor), que promove uma adesão denominada localizada (AL), diferente do que ocorre em outros sorogrupos de *E. coli*. O efeito chamado *attachment and effacement* é outra característica da EPEC, causado por uma proteína (intimina) que destrói as microvilosidades e promove o acúmulo de actina no local da adesão (Franco & Landgraf, 1996).

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC) é relacionada à *Shigella* por apresentar características comuns a essa bactéria, como inflamação e necrose da mucosa do cólon (Campos & Trabulsi, 1999). Clinicamente, as infecções por EIEC se manifestam por diarreia sanguinolenta ou não, sendo frequentemente acompanhada por dores abdominais e febre. Entre os fatores de patogenicidade estão a capacidade de invadir e se espalhar lateralmente pelas células adjacentes da mucosa do cólon, levando a lise celular.

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) produz uma ou mais enterotoxinas termolábeis (LT-I e LT-II) e/ou termoestáveis (ST-I e ST-II) após a aderência das bactérias às células epiteliais do intestino delgado, cujos efeitos resultam no desenvolvimento de diarreia aquosa, conhecida como “diarreia dos viajantes” (Franco & Landgraf, 1996). A produção das enterotoxinas LT-I, ST-I e

ST-II, bem como de alguns dos fatores de colonização conhecidos, são codificados por plasmídios . A produção da toxina LT-II, por sua vez, é codificada por genes cromossômicos.

Escherichia coli enteroagregativa (EAggEC) produz toxina termoestável e causa diarreia aquosa através de mecanismo ainda não conhecido (Ormenese et al., 1999). Campos & Trabulsi (1999) dividem *E. coli* com características agregativas em dois grupos: *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC). A primeira tem padrão agregativo de adesão que lembra tijolos empilhados, quando associadas a células Hep-2 ou HeLa e produz fímbria codificada por plasmídio, denominada AAF/I (*aggregative adherence fimbriae* I), provavelmente responsável pela colonização. Também foram descritas produção de toxinas por EAggEC: uma termoestável (EAST-I), semelhante à enterotoxina ST de ETEC e outra relacionada antígenicamente à hemolisina de *E. coli*, que induz ao aumento de cálcio intracelular e a fosforilação de várias proteínas da célula hospedeira.

Escherichia coli que adere difusamente (DAEC) possui duas adesinas diferentes que seriam responsáveis pela adesão difusa em células HeLa ou Hep-2. Uma é de natureza fimbrial e codificada por cromossomo (F1845) e outra não-fimbrial, mediada por plasmídio (AIDA-I). Nataro et al. (1987) afirmam que aderência agregativa (AA) foi distinguida por autoaglutinação proeminente das bactérias umas às outras. Na aderência difusa (DA), a bactéria é vista dispersa sobre a superfície de células Hep-2.

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) ou produtora de verotoxina (VTEC), produz toxinas conhecidas como Stx1 ou Stx2 e chamadas de toxinas “Shiga-like”, por serem similares às produzidas por *Shigella dysenteriae* tipo I (Weagant et al., 1994).

Nataro & Karper (1998), descreveram que no grupo VTEC estão as *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), cujo sorotipo protótipo é o O157:H7, que são associadas à doenças humanas que variam desde quadros diarreicos simples até casos complicados de colite hemorrágica (HC), síndrome hemolítico urêmico (HUS) e púrpura trombótica trombocitopênica.

Segundo Bell & Kyriakides (2000), HUS causada por VTEC é caracterizada por insuficiência renal aguda, anemia hemolítica e trombocitopenia e normalmente ocorre em crianças com idade inferior a 5 anos. No Reino Unido e em vários outros países é a principal causa de insuficiência renal aguda. Em torno de 10% de doentes infectados com VTEC O157 apresentam sintomas de HUS e alguns adultos apresentam sintomas de púrpura trombocitopênica. A infecção por VTEC O157 pode levar o paciente a óbito, variando consideravelmente as porcentagens de mortalidade, que podem chegar até 9% em surtos institucionais, (Stewart et al.,1997).

Verotoxina 1 e 2 são os principais fatores de virulência associados com colite hemorrágica e HUS, possivelmente porque elas interagem com as células endoteliais no local da infecção e no glomérulo e arteríolas renais (Kaplan et al., 1990). McDaniel & Kaper (1997) afirmaram que VTEC produz outros fatores de virulência, incluindo intimina (*eae*) e enterohemolisina A (*ehxA*), responsáveis pelas características histopatológicas das lesões de adesão/lesões das microvilosidades e da mucosa das células intestinais.

Em artigo publicado em 1968, que descreveu HUS na África do Sul, Kibel & Bernard sugeriram que uma “cepa mutante de *E. coli*” que teria recebido a mutação através de um bacteriófago, poderia ser responsável pela síndrome urêmica hemolítica. Em 1984, foi reconhecido que a verotoxina é codificada em um bacteriófago em *E. coli* (O'Brien et al., 1984) e que mais que 100 sorotipos diferentes desta bactéria podem expressar verotoxina (Karmali, 1989). Cepas do sorotipo O157:H7 estão intimamente relacionadas a EPEC O55:H7 não produtora de verotoxina (Whittan et al., 1993), um sorotipo que por muito tempo foi associado a surtos de diarreia infantil, e EHEC e EPEC compartilham muitos fatores de aderência intestinal e outros fatores de virulência.

Devido às diferenças de reações bioquímicas que *E. coli* O157:H7 apresenta em relação às outras *E. coli*, foram criados métodos diferenciados para isolar esse sorotipo específico em alimentos. Os microbiologistas de alimentos têm seguido essencialmente os avanços de profissionais da área clínica e o atual método de eleição para identificação de *E. coli* O157:H7 está baseado no uso convencional de

meios seletivos de enriquecimento e de cultivo em placa com emprego de esferas imunomagnéticas para a imunocaptura seletiva do organismo (Anon, 1997).

Segundo Franco & Landgraf (1996), as cepas de EHEC têm algumas propriedades que as diferenciam dos demais sorogrupos: não são capazes de utilizar o sorbitol, são β -glucuronidase negativas e têm dificuldade de se multiplicar ou não se multiplicam nas temperaturas normalmente empregadas para a pesquisa de *E. coli* em alimentos (44,5°C/45,5°C). Estudos de multiplicação celular, realizada em caldo de soja *trypticase* feitos por Doyle & Schoeni (1987), indicam que *E. coli* O157:H7 cresce rapidamente na faixa de temperatura de 30 a 42°C, com tempo de geração de 0,49 h e 0,64 h a 37°C e 42°C respectivamente.

Bell & Kyriakides (2000) fizeram um comentário sobre as formas de identificação de *E. coli*, afirmando que a capacidade para subtipagem ou identificação genética dos sorogrupos dessa bactéria é importante na vigilância de *E. coli* enteropatogênica, na pesquisa de surtos de enfermidades e para os controles no processamento dos alimentos.

Os métodos utilizados para subtipar *E. coli* incluem a biotipagem, a sorotipagem, a fagotipagem, a tipificação com colicina, a tipagem com arranjo do modelo da proteína de membrana externa, os modelos de resistência aos antimicrobianos (perfil de resistência), a hemaglutinação direta, o perfil das enzimas intracelulares, o perfil plasmidial e a produção de enterotoxinas. As provas de motilidade, o tipo de Verotoxina, a fagotipagem e o modelo de eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE) têm sido usados em esquemas práticos para diferenciar as cepas de VTEC O157 (Advisory Committee on the Microbiological Safety Food, 1995; Pennington, 1997).

Existem diversas fontes que podem ser usadas como referência na seleção do método apropriado, como as publicações da British Standards Institution, a International Standards Organization e a International Dairy Federation. Os métodos têm sido revisados, realizados e validados por organismos respeitados como o Public Health Laboratory Service (UK), a Association of Official Analytical Chemists (USA) e a Campden and Chorleywood Food Research Association (UK).

As toxinfecções por *E. coli* são adquiridas, principalmente, através da ingestão de alimentos contendo bactérias patogênicas viáveis, às quais se aderem à mucosa do intestino humano e se proliferam colonizando-o e produzindo toxinas e/ou invasão celular. Evidências epidemiológicas e estudos em alimentos relacionados com a enfermidade humana indicam que a dose infecciosa de *E. coli* Verotoxigênica pode ser muito baixa, sendo menor que 100 células do organismo (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, 1995; Bolton *et al.*, 1996).

E. coli enterohemorrágica ficou mundialmente conhecida devido a surtos de infecção alimentar decorrentes da ingestão de hambúrgueres contaminados com esta bactéria. A transmissão pessoa a pessoa também pode ocorrer pela via fecal-oral (Campos & Trabulsi, 1999).

A maior parte das infecções causadas por *E. coli* O157:H7 tem origem em alimentos, sendo estimados de 10.000 a 20.000 casos de toxinfecção por este microrganismo por ano nos EUA, com mais de 250 mortes (CDC, 1997).

Em estudo realizado no sul do Rio Grande do Sul - Brasil, os bovinos foram considerados o principal reservatório de VTEC. De acordo com Moreira (2001), 48,9% (119/243) dos animais pesquisados apresentaram *E. coli* produtoras de verotoxina. Entretanto, apenas 2,9% dos animais eram portadores de sorogrupos patogênicos (O157, O91, O112). A autora sugeriu que na região há uma variedade de sorogrupos de VTEC patogênicas para bovinos.

Nos EUA o sorotipo predominante é o O157:H7 que foi encontrado em 63% dos confinamentos investigados em 13 estados (Hancock *et al.*, 1997) em 0,5 a 2% das amostras de fezes de animais (Hancock *et al.*, 1998).

As práticas ao longo da produção de um alimento, assim como as condições de higiene da planta processadora influenciam diretamente na condição sanitária do produto alimentar. Em planta de abate, o risco de contaminação da carcaça por microrganismos de origem fecal é alto. Por essa razão, programas de controle e de redução de patógenos são recomendados pelos organismos de inspeção sanitária. Uma das formas de se controlar a contaminação é o monitoramento e a verificação dos processos através da coleta de amostras das

carcaças. Sanderson *et al.* (1995) citaram que o trato intestinal de ruminantes, particularmente bovinos e ovinos, parece ser o principal reservatório das cepas enterohemorrágicas de *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O157:NM, havendo uma incidência em fezes em torno de 0 a 10%.

A diferenciação dos sorogrupos, juntamente com outras características, como o biotipo, o fagotipo e a produção de enterotoxina, podem diferenciar aquelas cepas capazes de produzir enfermidade infecciosa no homem e nos animais (Linron & Hinton, 1988).

Em razão da existência de sorogrupos de *E. coli* potencialmente enteropatogênicos aos consumidores, buscou-se identificar aqueles predominantes entre cepas isoladas de amostras de água de lavagem de carcaças e de carcaças de ovinos abatidos em frigoríficos com fiscalização da Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do RS.

Dentre os sorogrupos comerciais disponíveis no mercado para a realização do teste de aglutinação, utilizado na identificação dos sorogrupos, não está incluído o sorogrupo das EHEC. Existe somente um grupo representado nos sorogrupos no *kit* do teste: o O157. Por essa razão, todas as cepas de *E. coli* que não aglutinaram em nenhum dos sorogrupos comerciais, foram testadas para a produção de verotoxina através da técnica do cultivo em células Vero.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizadas 176 cepas de *E. coli* isoladas de superfície de carcaças de ovinos e de amostras de água de lavagem dessas carcaças, provenientes de 4 diferentes frigoríficos, todos com fiscalização sanitária realizada pelo CISPOA. As cepas foram mantidas temporariamente em TSA e reativadas no momento dos testes. Para a identificação dos sorogrupos, utilizaram-se soros polivalentes⁴ acondicionados em frascos de 3 mL, que continham anti-soros contra os seguintes

⁴ PROBAC DO BRASIL

sorogrupos: EPEC A (anti O26, O55, O111, O119), EPEC B (anti O114, O125, O142, O158), EPEC C (anti O86, O126, O127, O128), EIEC A (anti O26 ac, O29, O136, O144, O152), EIEC B (anti O112 ac, O124, O143, O164, O167) e soro anti *E. coli* O 157 (enterohemorrágica).

Para o teste da produção de verotoxina, foram testadas 32 cepas de *E. coli*, utilizando-se células de rim do Macaco Verde Africano, denominadas células Vero. Estas cepas foram selecionadas por não terem apresentado reação de aglutinação nos soros comerciais testados (EPEC A, EPEC B, EPEC C, EIEC A, EIEC B, O 157).

Metodologia

O sorogrupo foi identificado através da técnica de sorologia de aglutinação rápida em lâmina. Para isso, foi feita uma suspensão do microrganismo com água esterilizada peptonada (0,1%) em uma lâmina de vidro. Acrescentou-se, então, o soro polivalente adicionando-se uma gota no homogeneizado preparado. A leitura foi feita através da visualização (positivo) ou não (negativo) da formação de grumos.

A produção e detecção de verotoxina foi determinada pela prova de citotoxicidade em células Vero como descrito por Blanco *et al.* (1996), com modificações segundo Moreira (2001). As cepas estocadas em ágar TSA foram inoculadas em 1 mL de TSB (caldo de triptona de soja) e submetidas a crescimento por 18 horas à 37°C em agitador orbital a 240 rpm. Após, o cultivo foi centrifugado (18.000 g) por 25 minutos a 4°C. Os sobrenadantes contendo as toxinas foram estocados a -18°C até o momento do teste.

Foram preparadas placas de cultivo celular com 96 cavidades para o ensaio de citotoxicidade. Cada cavidade continha uma monocamada de células Vero confluentes na concentração de 10^5 células suspensas em 100 μ L de Meio Essencial Mínimo (MEM)⁵, suplementado com 10% de soro fetal bovino⁶, 1% de L-

⁵ Cultilab, Campinas

⁶ Cultilab

Glutamina⁶, e 100000 UI de penicilina G, 100 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por litro, por 24 horas à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

Após 24 h de incubação, retirou-se o meio esgotado e colocou-se 100 µL de MEM enriquecido com soro fetal bovino. A seguir, foram preparadas três diluições (1/4, 1/8 e 1/16) das preparações de toxinas que foram incubadas novamente à 37°C e 5% de CO₂. As alterações morfológicas nas células foram observadas após 24 e 48 h de incubação com um microscópio de contraste de fase invertido. Uma cepa *E. coli* K-12 foi utilizada como controle negativo e uma cepa de *E. coli* O157:H7 foi utilizada como controle positivo em cada placa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sorogrupo prevalente foi EPEC (72,25%), com uma distribuição de 83% para EPEC B, 28% de EPEC A e 14% de EPEC C. O sorogrupo EIEC representou minoria, com 12,14% de ocorrência entre as cepas (42,85% EIEC A e 57,14% EIEC B).

Das 9 cepas de *E. coli* provenientes de amostras de água de lavagem das carcaças, 3 do F4 foram positivas para o sorogrupo polivalente EPEC B e 1 cepa para o EIEC A. Das 5 cepas do F1, apenas 1 aglutinou no soro EPEC B e as demais não foram reativas a nenhum dos soros polivalentes testados.

Considerando-se as cepas isoladas em relação aos frigoríficos (TABELA 1), a prevalência do sorogrupo EPEC A foi significativa no F1(12/41) e no F3 (11/67). EPEC B foi menos significativa no F4, comparando-se aos demais frigoríficos, por apresentar apenas 3 cepas, porém foi a que predominou nessas cepas provenientes desse abatedouro.

Existem poucas publicações que relatam a identificação de sorogrupos de *E. coli* em amostras de origem cárnea e, menos ainda, a respeito da identificação do sorogrupo. Em 1967, *E. coli* enteropatogênica provocou um surto na Inglaterra devido à carne de porco contaminada, e outro em 1973, através da ingestão de torta de carne contendo a bactéria (Doyle & Cliver, 1990). Os autores relatam em

⁶ Cutilab

seu trabalho um surto com EIEC, em 1971, onde a ingestão de queijo Camembert, de origem francesa, estava contaminado com *E. coli* enteroinvasora na concentração de 10^5 a 10^7 microrganismos.g⁻¹.

TABELA 1: Distribuição de prevalência de sorogrupos de *E. coli* nas carcaças de ovinos analisadas em 4 frigoríficos

Sorogrupo	F1 (n° cepas)	F2 (n° cepas)	F3 (n° cepas)	F4 (n° cepas)	Total
EPEC A	12	01	11	02	26/167
EPEC B	25	19	31	03	78/167
EPEC C	01	05	07	01	14/167
EIEC A	01	04	01	02	08/167
EIEC B	01	01	09	01	12/167
O 157	0	0	0	0	0/167

F1 = Frigorífico 1; F2 = Frigorífico 2; F3 = Frigorífico 3; F4 = Frigorífico 4

Outro surto, em 1980, ocorreu devido a contaminação por ETEC em um restaurante mexicano, sendo constatado que a fonte de contaminação foi um dos cozinheiros, que apresentava quadro diarréico duas semanas antes do surto (Doyle e Cliver, 1990).

Em pesquisa com derivados lácticos, Pereira *et al.* (1998), ao estudarem 168 amostras de queijo provenientes da região sudeste do Brasil, verificaram que 21 (11,09%) eram carreadoras de EPEC, sendo que as amostras provenientes de estabelecimentos que não recebiam o Serviço de Inspeção Federal (SIF) foram as que mais apresentaram resultados positivos. Esse grau de contaminação está próximo ao reportado por Nascimento *et al.* (1988), que relataram 9,8% de contaminação por EPEC para o queijo frescal coletado em Ouro Preto - MG. EPEC provocou um surto nos Estados Unidos em 1968, devido a ingestão de

água não clorada, proveniente de poço artesiano, e provavelmente contaminada com fezes humanas.

Doyle & Cliver (1990) descreveram ainda que poucos alimentos têm sido associados a surtos de toxinfecção alimentar por EIEC, porém salmão, carne de aves, leite e queijo Camembert têm sido veículos desse sorogrupo.

Em nosso estudo, nenhuma cepa pertenceu ao grupo das O157. As cepas provenientes de amostras de carcaças e de água (n=32) que não reagiram aos soros comerciais polivalentes disponíveis, foram então testadas quanto a produção de verotoxina através do teste de inoculação de seus sobrenadantes em células Vero (Figura 1).

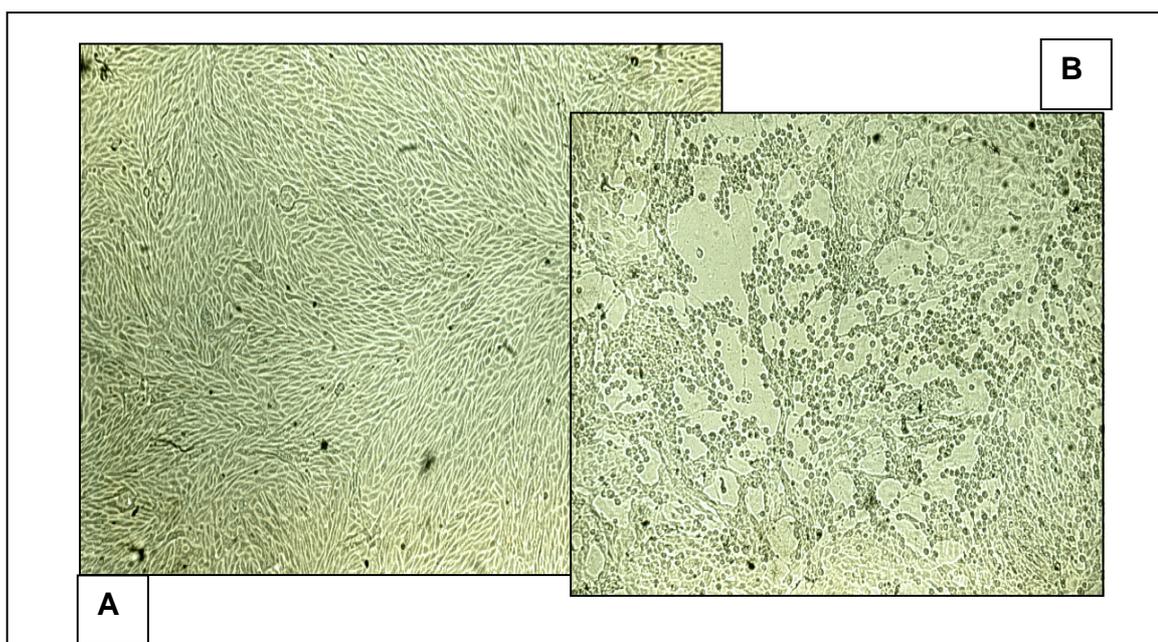


FIGURA 1: Efeito citotóxico de verotoxina em células Vero: A = Células Vero íntegras, antes da inoculação; B = lise celular provocada pelo efeito citotóxico da verotoxina.

Das 32 cepas testadas, 8 (25%) apresentaram efeito citotóxico em células Vero, após 48 h. Nenhuma dessas cepas era proveniente de amostra de água de lavagem de carcaças, indicando que esta não foi a fonte de contaminação. Das 8 cepas de VTEC, 7 pertenceram ao mesmo frigorífico (Frigorífico 3).

Do total de cepas isoladas, 4,5% (8/176) foram produtoras de verotoxina. Nos EUA o sorotipo predominante é o O157:H7 que foi encontrado em 63% dos confinamentos investigados em 13 estados (Hancock et al., 1997) e em 0,5 a 2% das amostras de fezes de animais (Hancock et al., 1998).

Beutin et al. (1997) afirmaram que, na Alemanha, VTEC tem sido isolada em uma gama de animais utilizados para a produção de leite, que incluem as vacas, as ovelhas e as cabras. Nesse estudo, foi comprovado que VTEC também poderá contaminar a superfície de carcaças de ovinos, entretanto não pesquisou-se em nível de sorotipo. Não foi possível estabelecer a origem de contaminação, porém os resultados indicam que a água de lavagem dessas carcaças não era fonte desse tipo de *E. coli*, já que não foi isolada dessas amostras.

Doyle e Schoeni (1987) detectaram *E. coli* verotoxigênica (O157:H7) em amostras de carne fresca no comércio varejista dos Estados Unidos: 3,7% em carne bovina (6/164), 1,5% em carne suína (4/264), 1,5% em aves (4/263) e 2% em carne de cordeiro (4/205).

Bell & Kyriakides (2000) salientaram que mesmo os alimentos e produtos classificados como de baixo risco em relação à *E. coli* verotoxigênica, podem ser capazes de causar surtos, se os controles intrínsecos na fabricação normal desses produtos não for realizada corretamente.

Das 176 cepas testadas, 24 não pertenceram a nenhum sorogrupo enteropatogênico para humanos, incluindo cepas provenientes das amostras de carcaças dos 4 frigoríficos pesquisados e de amostra de água do F1.

Em estudo realizado no Rio Grande do Sul - Brasil, Moreira (2001) considerou que os bovinos foram o principal reservatório de VTEC. Dentre os resultados encontrados, 48,9% (119/243) dos animais pesquisados apresentaram *E. coli* produtoras de verotoxina, sendo que apenas 2,9% dos animais

apresentaram sorogrupos patogênicos (O157, O91, O112). A autora sugere que na região há uma variedade de sorogrupos de VTEC patogênicos em bovinos.

Fey *et al.* (2000) relataram que 60 sorotipos de VTEC têm sido implicados em doenças diarreicas, e muitos sorotipos não-O157:H7 têm sido causadores de surtos de origem alimentar e HUS nos Estados Unidos, Europa e Austrália. Estes autores demonstraram que sorotipos VTEC não-O157:H7 foram pelo menos tão prevalentes quanto o sorogrupo O157:H7 em amostras de pacientes com diarreia, no estado de Nebraska (USA).

Em estudos sobre a prevalência de *E. coli* O157:H7 em gado leiteiro e de corte, Hancock (1998) observou que menos de 10% do gado carregava esse patógeno. Porém, em pesquisa delineada por Chapman *et al.* (1997), esta bactéria foi isolada em 38% das amostras de fezes de bovinos destinados ao abate durante a primavera, enquanto que no inverno, a média foi de 4,8%, evidenciando assim, a interferência da sazonalidade na taxa de isolamento de *E. coli* O157:H7.

Cerqueira *et al.* (1997), ao estudarem fatores de patogenicidade de *E. coli* enteropatogênicas em 105 amostras de carne bovina crua isoladas no Rio de Janeiro - RJ, detectaram que VTEC foi a categoria encontrada com maior frequência, correspondendo a 21 (50%) das 42 cepas de *E. coli* enteropatogênica, porém *E. coli* O157:H7 não foi isolada. O sorogrupo ETEC foi encontrado em 40,5% das cepas (17 cepas provenientes de 14 amostras), enquanto que EPEC foi encontrado em apenas 4,8% das cepas (2 cepas provenientes de 2 amostras). Nenhuma cepa de *E. coli* pertencia ao sorogrupo EIEC. Os autores sugerem que a ausência de EIEC em amostras de carne bovina em outros estudos (Franco *et al.*, 1985), reforçam os relatos de que os alimentos não são veículo proeminente de EIEC no Brasil.

Em nosso estudo, embora as amostras de carne tenham sido de espécie diferente, EIEC foi encontrado em baixa prevalência, porém estava presente em 13% (23/176) das cepas de *E. coli* analisadas.

Em 1994, um surto com 23 casos de infecção devido a *E. coli* O157:H7, em Washington e na Califórnia, foi atribuído ao consumo de salame seco fermentado

fatiado (Alexander *et al.*, 1995). O pH das amostras de salame estava entre 4,9 e 5,0, com 3,7 a 3,9% de sal e foi estabelecido que cada um dos 4 pacientes estudados consumiram menos de 50 células de *E. coli* O157:H7 (Tilden *et al.*, 1996). Essa pesquisa não comprovou que houve contaminação após o processamento e, provavelmente, a causa do surto foi pela contaminação da matéria-prima (Glass *et al.*, 1992; Hinkens *et al.*, 1996).

Esses dados demonstram a importância da prevenção e dos cuidados que se devem tomar durante o processamento das matérias-primas. No RS, a carne ovina é amplamente consumida, sendo até mesmo, utilizada como matéria-prima para produtos embutidos.

4. CONCLUSÕES

EPEC foi o sorogrupo prevalente, tanto em amostras de carcaças de ovinos quanto na água utilizada para a lavagem das carcaças. Nenhuma cepa pertencia ao sorogrupo O157 e 18,18% (32/176) não pertenciam a nenhum sorogrupo enteropatogênico para humanos.

Carcaças de ovinos podem carrear *E. coli* produtora de Verotoxina. Entretanto, nos frigoríficos estudados, a água de lavagem dessas carcaças não está sendo fonte de contaminação desse tipo de *E. coli* enteropatogênica.

III. DISCUSSÃO GERAL

A Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado do RS, responsável por inspecionar os frigoríficos que comercializam seus produtos dentro do estado, utiliza o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos como referência para a verificação das condições sanitárias dos produtos. O referido regulamento, sob resolução – RDC nº 12 de 12 de janeiro de 2001 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), não especifica padrões microbiológicos para *Escherichia coli* em carcaças refrigeradas, porém o Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, baseado no Food Safety Inspection Service (FSIS) dos EUA, recomenda pesquisa desse agente como forma de regulamentação da redução de patógenos, servindo como instrumento para verificar controle de processos.

O U.S. Department of Agriculture's Food Safety Inspection Service (USDA – FSIS) instituiu o regulamento FSIS de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle /Redução de Patógenos, o qual requer que todos os abatedouros de bovinos e de aves enumerem *E. coli* nas carcaças. Para carcaças de bovinos, o nível de *E. coli* que é considerado “aceitável” é zero. Um nível de 1 a 100 UFC/cm² é considerado “marginal” e maior que 100 UFC/cm² é considerado “inaceitável” (USDA-FSIS, 1996a). Para carcaças dessa espécie animal, deve-se avaliar uma

carcaça a cada 300 animais abatidos. Em decorrência da necessidade de testar grande quantidade de amostras por dia, muitos estabelecimentos, que abatem bovinos ou aves, estão estruturando laboratórios internos para atenderem essas exigências, lançando mão de testes rápidos que imprimam confiabilidade, praticidade e simplicidade na sua execução.

O índice de contaminação por bactéria de origem fecal nas carcaças de ovinos, nos frigoríficos pesquisados, foi alta, com 93,3% (56/60) de *E. coli*. Vanderlinde et al. (1999) encontraram níveis de até 75% de carcaças ovinas contaminadas pelo microrganismo. Se utilizarmos como referência os padrões descritos pela Food Security Inspection Service (FSIS), empregado para amostras de carcaças de bovinos, o resultado (1,47 NMP/cm²) da média de *E. coli* nas 60 carcaças ficou dentro da “classe marginal” (menor ou igual a 100 UFC/cm²), indicando assim, que os controles de processos dentro dos frigoríficos devem ser revisados.

Os coeficientes de correlação negativa entre a concentração de cloro e a enumeração de Coliformes totais ($r = -0,77$) e a de mesófilos aeróbios facultativos ($r = -0,96$) na água de lavagem das carcaças, comprovou a importância da correta cloração como forma de controlar a qualidade sanitária da água. A concentração de cloro teve interferência direta sobre a contaminação das carcaças, já que no frigorífico (F1), em que a água não possuía cloro residual, a média da enumeração de CF foi a mais alta (3,65 NMP/cm²) e a de *E. coli* a segunda mais alta (2,21 NMP/cm²).

Os frigoríficos sob Inspeção Sanitária Estadual são de médio a pequeno porte, tornando-se inviável a instalação de equipamentos mais sofisticados, como um pasteurizador, para o controle de bactérias contaminantes da superfície da carcaça. O controle intensificado sobre a cloração da água de frigoríficos que não possuam sistema de abastecimento pela rede pública torna-se indispensável em abatedouros localizados em zonas afastadas do perímetro urbano, onde a utilização de poços artesianos faz-se necessária. Esse trabalho comprovou que a correta cloração da água de lavagem das carcaças é importante para diminuir a

contaminação do produto por bactérias de origem fecal, sendo um método simples, de baixo custo e eficaz.

A lavagem das carcaças com pressão é indicada pelos organismos de fiscalização sanitária que atuam em frigoríficos. Nesse trabalho, o abatedouro onde não houve a utilização de pressão na água, apresentou os menores índices médios de contaminação das carcaças, confirmando o que foi descrito por Bell & Kyriakides (2000). Frente a esse resultado, torna-se importante que sejam realizados novos estudos, com maior número de amostras, visando dar um maior suporte quanto à utilização desta prática em plantas de abate de animais.

De acordo com o questionário aplicado, todos os frigoríficos apresentavam pontos em comum como o direcionamento aleatório do jato da água de lavagem das carcaças, que promove a disseminação das bactérias por toda a superfície da carcaça. Essas práticas podem ser facilmente controladas através da instrução aos funcionários, fazendo com que estes realizem suas atividades de forma correta, o que pode ser alcançado, por exemplo, através de algum tipo de premiação, a fim de motivá-los. A esfolagem manual, realizada por todos os frigoríficos estudados, pode auxiliar na contaminação, já que o funcionário utiliza as mãos e o braço para afastar a pele do dorso da carcaça. Seria interessante que se propusesse outra forma de trabalho, evitando, de alguma maneira, o contato do braço do trabalhador com a carcaça.

Outras ações simples de BPFs, que devem ser realizadas pelos funcionários, como a lavagem de mãos e botas antes de entrar na planta frigorífica, devem ser permanentemente incentivadas. Em nosso estudo, possivelmente o relapso dessas atividades tenham relação com as maiores contagens vistas. Aspectos da construção do prédio, como a forma de escoamento da água de lavagem de mãos e botas, paredes com cantos arredondados e separação da área suja e da área limpa também são de fundamental importância no controle dos patógenos e devem ser exigidos pelo CISPOA.

Quando for realizada higienização e sanitização criteriosa entre um abate e outro, o abate de diferentes espécies animais na mesma linha de matança

difícilmente interferirá na contaminação cruzada entre as espécies. Porém, nos frigoríficos visitados, era feita somente uma higienização com água, sem a devida aplicação de agentes sanitizantes ou água quente (82,2 a 85°C). Assim, microrganismos contaminantes de bovinos, ovinos e suínos, tornam-se comuns às carcaças de todas as espécies abatidas no mesmo dia.

O sorogrupo prevalente foi EPEC, seguido, em menores proporções, por EIEC. Apesar de haver surtos de EPEC descritos na literatura, não é muito comum acometer adultos saudáveis. Porém, de acordo com Whittan *et al.* (1993), cepas do sorotipo O157:H7 estão intimamente relacionadas a EPEC O55:H7, estabelecendo-se, dessa forma, a proximidade de cepas EHEC e EPEC, as quais compartilham muitos fatores de aderência intestinal e outros fatores de virulência.

A fonte de contaminação das carcaças não foi estabelecida, porém há suspeitas de que os próprios funcionários possam servir como veículo contaminante, através de maus-hábitos de higiene pessoal e a não realização da prática da lavagem de mãos antes de começarem as atividades. Essa teoria está fundamentada na afirmação de Campos & Trabulsi (1999), em que a forma mais comum de transmissão de EPEC seja por contato pessoa-pessoa e que seu reservatório parece ser o homem. Em um dos frigoríficos (F4), a água de lavagem das carcaças pode estar interferindo na contaminação destas, já que todas as cepas encontradas nas amostras de água pertenciam ao sorogrupo EPEC.

Se levarmos em consideração Doyle & Schoeni (1987), que publicaram trabalho afirmando que cepas do sorotipo O157:H7 não se multiplicam bem em temperaturas superiores a 44°C, diríamos que em nosso estudo, o sorogrupo O157 não foi detectado em razão da temperatura empregada pela metodologia tradicional. Entretanto, deve-se levar em consideração que outra pesquisa demonstrou que todas as cepas O157 testadas cresceram a 45°C, mesmo em Caldo EC (Palumbo *et al.*, 1995), o qual é um meio seletivo por excelência para a detecção de *E. coli*. Dessa maneira, a razão de não ter sido encontrada O157 nas amostras de superfície de carcaças de ovinos pode não ter sido em decorrência da temperatura empregada pela metodologia padrão durante a inoculação do Caldo EC (44,5°C) e sim por possivelmente não haver esse tipo de *E. coli* nos

frigoríficos pesquisados. Outra hipótese, de acordo com Ferenc *et al.* (2000), seria de que a concentração desse sorotipo de *E. coli* nas amostras seria baixa para que sua presença fosse detectada frente à temperatura empregada e ao meio seletivo (contendo sais de bile). Porém, para podermos afirmar que não houve *E. coli* O157, teríamos que utilizar outro meio como o Àgar MacConkey Sorbitol, o qual é incubado a temperaturas mais baixas.

O número de isolados produtores de verotoxina foi baixo (8/176). Porém, nossos resultados foram superiores (4,5%) aos obtidos por Doyle e Schoeni (1987), em amostras de carne de ovinos, os quais foram de 2% (4/205). Dos isolados provenientes de amostras de água, nenhum produziu verotoxina, indicando que esta não era a fonte de contaminação das carcaças. O F3 possivelmente tenha alguma fonte de contaminação de *E. coli* verotoxigênica diferente dos outros frigoríficos, ou possivelmente houvesse animais portadores, já que a maioria dos isolados (7/ 8), pertenciam a esse frigorífico. Entretanto, não foi possível verificar se os ovinos abatidos eram portadores de VTEC, já que não coletou-se amostras de fezes desses animais.

O baixo número de cepas verotoxigênicas, detectadas nesse estudo, é suficiente para servir de alerta do perigo que essas carcaças possam representar aos consumidores, já que evidências epidemiológicas e estudos em alimentos relacionados com a enfermidade humana indicam que a dose infecciosa de *E. coli* Verotoxigênica pode ser muito baixa, sendo menor que 100 células do organismo (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, 1995; Bolton *et al.*, 1996). Mesmo que, na maioria dos casos, a carne ovina seja consumida na forma de churrasco e eliminada durante a cocção, a contaminação pode ocorrer facilmente através de facas ou tábuas utilizadas para preparar a carne e, concomitantemente, preparar uma salada.

Townsend *et al.* (1998) e Russell (2000) relataram que quando os níveis de contaminação das amostras forem muito baixos ou muito elevados, o Petrifilm não é o método indicado. Em nosso estudo, provavelmente, a concentração de *E. coli*, nas amostras das carcaças ovinas foi baixa, fazendo com que o método NMP detectasse com maior sensibilidade as *E. coli* presentes. Porém, analisando-se

individualmente os resultados, a enumeração máxima de *E. coli* detectada pela metodologia tradicional, foi de 4,8 NMP/cm², enquanto que no método PetrifilmTM foi de 9,4 UFC/cm².

Todos os resultados obtidos nesse estudo servem para acumular dados referente ao controle de bactérias de origem fecal, potencialmente enteropatogênicas, nos frigoríficos com Inspeção Estadual. Pode-se considerar que seja um estudo-piloto acerca dos abatedouros existentes nessa cidade e que seria indicada uma pesquisa mais abrangente, com um número maior de amostras e de estabelecimentos. Para isso, seria necessária a participação direta e efetiva de fiscais do CISPOA e da colaboração de outros laboratórios, para que se possa relacionar os índices de contaminação com outros fatores como a época do ano e, preferivelmente, estabelecer as principais fontes de contaminação a fim de reduzi-las.

Faz-se também necessária a inclusão de mensagens nas embalagens das carnes frescas, que indiquem os cuidados que o consumidor deve ter para o preparo desse tipo de alimento, como já é obrigatório nos Estados Unidos. Por esse tipo de produto ser proveniente de manipulação, torna-se possível a contaminação por microrganismos patogênicos. No Reino Unido, esta advertência é realizada em forma de folhetos gerais sobre o risco ou perigos que os alimentos possam representar a população, sendo publicados pelo Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentação (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1991).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, E. R. BOASE, J., DAVES, M. *et al.*: *Escherichia coli* O157:117 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami – Washington and California, 1994. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. 44, pp. 157-160, sep. 1995.
- ANON: Development and use of microbiological criteria for foods. **Food Science and Technology Today**, n.11, pp.137-177, Mar. 1997.
- ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD: **Report on Vero Cytotoxin-Producing *Escherichia coli***. London: HMSO, 1995.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION WATER AND WASTEWATER: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 16^a ed, 1992,a .
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, WASHINGTON, 1985.AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA): **Compendium for Methods for the Microbiological examination of Foods**. Ed. Vanderzant., C. & Splittspoesser, D. F., 3^a ed., New York, 1992,b.
- BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL FOR FOODS. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (BAM) **U.S. Dept. Health, Education and Welfare**, 8th Ed. Washington D. C.1998.
- BELL, C. & KYRIAKIDES, A: ***E. coli* – Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos**. Zaragoza, Espanha: Acribia, 234 p., 2000.
- BELL, R.G., C.L. HARRISON and A.R. ROGERS. A preliminary investigation of the distribution fo microbial contamination on lamb and beef carcasses. Meat Industry Research Institute of New Zealand. Technicecal Report N° 927. Hamton: MIRINZ, 1993.
- BEUTIN, L., GEIER, D., STEINRÜCK, H. *et al.*: Origein and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. **Epidemiology and Infection**, n. 118, pp. 199-205, 1997.

- BLANCO, M., BLANCO, J. E., MORA, A., PRADO, C., ALONSO, M. P., MOURIÑO, M., MADRID, C., BALSALOBRE, C., JUÁREZ, A.: Distribution and characterization of fecal veotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). **European Journal of Epidemiology**. pp. 13-19, Dez. 1996.
- BOLTON, F., CROZIER, L. AND WILLIAMSON, J.: Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p.317-321, 1996.
- BOOK, S. A. **Statistics: Basic techniques for solving applied problems**. New York, MacGraw-Hill Book, 1977, 511p.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria n. 1469 de 29 de dezembro de 2000, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 14E, 19 de jan. 2001. seção 1.
- BRASIL, Portaria número 100 de 10 de Agosto de 1993. Métodos analíticos para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – métodos microbiológicos, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, número 156, Agosto de 1993, Seção I.
- CABEDO, L., SOFOS, J., SMITH, G: Removal of bacteria from beef tissue by spray washing after different times of exposure to fecal material. **Journal of Food Protection**, v.59, n.12, p.1284-1287, Dec. 1996.
- CAMPOS, L. & TRABULSI, L., *In*: TRABULSI, R.T., ALERTHUM, F., CANDEIAS, J.N., GOMPETZ, O.F: **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 586 p., 3 ed., 1999.
- CASTILLO, A., LUCIA, L., GOODSON, K., SAVELL, J., ACUFF, G: Use of hot water for beef carcass decontamination. **Journal of Food Protection**, v.61,n.1,p.19-25, Jan. 1998.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1999, 216 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC): Foodborn diseases active surveillance network. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, n. 46, pp. 258-261, 1997.

CERQUEIRA, A., TIBANA, A. and GUTH, B: High occurrence of Shig-Like Toxin-Producing strains among Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, pp. 177-180, 1997.

CHAPMAN, P., SIDDON, C., CERDAN, A. and HARKIN, M: **Epidemiology Infection**, n. 119, pp.245-250, 1997.

CORRY, J., JAMES, C., JAMES, S: *Salmonella, Campylobacter and Escherichia coli* O157:H7 decontamination techniques for the future. **International Journal of Food Microbiology**, n.28, pp.187-196, 1995.

CUTTER, C., DORSA, W. and SIRAGUSA, G: Application of Carnatrol™ and Timsen™ to decontaminate beef. **Journal of Food Protection**, n.59, pp.1339-1342, Dec. 1996.

DEAM, A., DEAM, J., COULMOBIER, D., BRENDEL, K. , SMITH, D. , BURTON, A., DICKER, R., SULLIVAN, K., FAGAN, R. , ARNER, T: Epi Info Version 6.0. A word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. **Centers for Disease Control and Prevention**, Atlanta, GA, 1994.

DICKSON, J: Control of *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 on beef in a model spray chilling system. **Journal of Food Science**, v.56,n.1, p.191-193, 1991

DORSA, W: New and established carcass decontamination procedures commonly used in the beef-processing industry. **Journal of Food Protection**, v.60, n.9, p.1146-1151, sep. 1997.

DOYLE, M. and CLIVER, D: *Escherichia coli*, In: CLIVER, D. (ed) **Foodborn Diseases**, London: Academy Press, pp. 209-215, 1990.

- DOYLE, M. and SHOENI, J: Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology**, n.48, pp.855-856, Apr. 1987.
- FERENC, J., OLIVER, J., WITKOWSKI, R., McLANDSBOROUGH, L. and Levin, R: Studies on the growth of *Escherichia coli* O157:H7 strains at 45.5°C. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 9, pp. 1173-1178, 2000.
- FEY, P., WICKERT, R., RUPP, M.,SAFRANEK, T. and HINRICHS, S: Prevalence of Non-O157:H7 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Diarrheal Stool Samples from Nebraska. **Emerging Infection Diseases**, v. 6, n. 5, Sep-Oct 2000.
- FRANCO, B., GUTH, B. e TRABULSI, L: Isolamento e características das cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de alimentos. **Revision on Microbiology**, n. 16, pp. 49-55, 1985.
- FRANCO, B. & LANDGRAF, M.:**Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182 p., 1996.
- GERMANO, P. e GERMANO, M: **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001, 629 p.
- GLASS, K. , LOEFFELHOLZ, J., FORD, J. et al: Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 58, pp. 2513-2516. Aug. 1992.
- HANCOCK, D., BESSER, T., RICE, D. et al. A longitudinal Study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. **Epidemiology and Infection**, n. 118, pp. 193-195, 1997.
- HANCOCK, D., BESSER, T. and RICE, D: *in* KAPER, J. and O'BRIEN, A: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin Producing *E. coli* strains. **American Society Microbiology**, Washington D.C, pp. 85-91, 1998.
- HINKENS, J., FAITH, N., LORANG, T. et al: Validation of pepperoni processes for control of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**. n. 59, pp. 1260-1266, Dez. 1996.

- HITCHENS, A., HARTMAN, P., TODD, E: Coliforms: *Escherichia coli* and its toxins, p.341, 1992. *In*: VAMDERZANT, C. and SPLITTSTOESSER, D: **Compedium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Helth Association, Washington, D.C.
- HOBBS, Betty C. & ROBERTS, Diane: **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998, 377p.
- INTERNATIONAL COMMITION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997, 377p.
- KAPLAN, B., CLEARY, T., OBRIG, T: Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. **Pediatric Nephrology**, n.4, pp. 276-283, 1990.
- KARMALI, M: Infection by verocytotoxinp-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review.**, n. 2, pp. 15-38, 1989.
- KIBEL, M. & ,BERNARD, P: The haemolytic-uremic syndrome: a survey in Southern Africa. **South African Medicine Journal**, n. 42, pp. 692-698, 1968.
- LEVINE, M: *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **Journal of Infection Disease**, n. 155, pp. 377-389, 1987.
- McDANIEL, T. & KAPER, J: A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype of *E. coli* K-12. **Molecular Microbiology**, n. 23, pp. 399-407, 1997.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD: Food Safety, A Guide from the Food safety directorate. **Ministry of Agriculture, Fisheries and Food**, London, 1991.
- MOREIRA, C. 2001. **Prevalência e fatores de risco de *Escherichia coli* verotoxigênica em bovinos de leite sadios na bacia leiteira de Pelotas – RS**. Dissertação defendida sob orientação de José Antonio Guimarães Aleixo – Pelotas: Universidade federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária. 4-5, 24 p.

- NASCIMENTO, D., SABIONI, J. e PIMENTE, N: Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) e enteroinvasora (EIEC) em queijo tipo Minas-Frescal da cidade de Ouro Preto. **Revista de Microbiologia**, v. 27, n. Suppl. 1, pp. 40-44, 1988.
- NATARO, J., KAPPER, J., BROWNE, R., PRADO, V., VIAL, P. and LEVINE, M: Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. **Pediatric Infection Disease Journal**, n.6, pp. 829-831, 1987.
- NATARO, J. and KAPER, J.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review.**, pp. 142-201, Jan 1998.
- NUTSH, A., PHEBUS, R., RIEMANN, M. et al: Evaluation of a steam pasteurization process in a commercial beef processing facility. **Journal of Food Protection**, n.60, pp.485-492, May, 1997.
- O'BRIEN, A., NEWLAND, J., MILLER, S., HOLMES, R., SMITH, H. and FORMAL, S: Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. **Science**, n. 226, pp. 694,696, 1984.
- ORMENESE, R.; SILVEIRA, N.; SILVA, N.: *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Boletim SBCTA**. Campinas, v 1, n 33, p. 41-49, 1999.
- ØRSKOV, F: Genus 1. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941 ^{AL}, in **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol 1 (eds N.R. Krieg and J.G. Holt). Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 420-423, 1984.
- PALUMBO, S., CALL, J. , SCHULTZ, F. and WILLIAN, A: Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, n. 58, pp. 352-356, 1995.
- PENNINGTON, T.H., The Pennington Group: **Report on the Circumstances leading to the 1996 outbreak of infection with *E. coli* O157 in Central Scotland, the implications for food Safety and the lesions to be learned.** The stationery office Ltda, Endingburg, 1997.
- PEREIRA, M., LEOCÁDIO FILHO, G., GASTELOS, M., RODRIGUES, D., ALVES, R. e HOFER, E: Queijo "Tipo Minas". IV – Pesquisa de *Escherichia coli*

enteropatogênica clássica (EPEC). *In Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, pp. 1010-1013, 1998.

PHEBUS, R., NUTSH, A. SHAFER, D. *et al.*: Comparison of steam pasteurization and other methods for reduction of pathogens on surfaces of freshly slaughtered beef. **Journal of Food Protection**, n.60, pp.476-484, May, 1997.

REPORT 71: The Microbiology of Water. Part 1 – Drinking Water. **Report on Public Health and Medical Subjects N° 71**. Methods for the Examination of Waters and associated Material HMSO, London, 1994.

RUSSELL, S: Comparison of the traditional Three-Tube Most Probable Number Method with the Petrifilm, SimPlate, BioSys Optical, and Bactometer Conductance Methods for enumerating *Escherichia coli* from chicken carcasses and ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 9, pp. 1179-1183, 2000.

SANDERSON, M., GAY, J., HANCOCK, C., GAY, C., FOX, L. and BESSER, T: Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 33, pp. 2616-2619, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 1997.

STEWART, A., JONES, G., McMENAMIM, J. *et al.*: Central Scotland *E. coli* O157 outbreak: clinical aspects (Monklands Hospital experience). **Scottish Centre for Infection and Environmental Health Weekly Report, Number 1**, n. 97/13, pp 9-11, 1997.

STIER, R: Development and confirmation of CCP's using rapid microbiological tests. **Journal of Rapid Tests and Automation in Microbiology**. n. 2, pp. 17-26, 1993.

TILDEN, J., YOUNG, W. McNAMARA, A. *et al.*: A New route of transmission for *Escherichia coli*: Infection from dry fermented salami. **American Journal of Public Health**, n.86, pp. 1142-1145, Aug. 1996.

TOPLEY, W. & WILSON, G.: **The Principles of Bacteriology and Immunity**. V.1, Edward Arnold &Co., London, pp. 1288-1293, 1929.

TOWNSEND, D., IRVING, R. and NAQUI, A: Comparison of the SimPlate Coliform and *Escherichia coli* Test with Petrifilm, Three-Tube MNP, and VRBA + MUG Methods for Enumerating Coliforms and *E. coli* in food. **Jornal of Food Protection**, v.61, n.4, pp. 444-449, 1998.

TUNCAN, E: Effect of cold temperature on germicidal efficacy of quaternary ammonium compound, iodophor, and chlorine on *Listeria*. **Jornal of Food Protection**, v.56, n.12, p.1029-1033, dec. 1993.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (a): Pathogen Reduction: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) systems: final rule. **Federal Registries**, n. 61, pp. 38929-38938, 1996.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (b): Pathogen Reduction: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) systems: final rule. **Federal Registries**. N. 61, pp. 38939-38944, 1996.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (c): Pathogen Reduction: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) systems. **Backgrounder**, p. 1, July 1996.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (d): How USDA's new food safety system will fight bacteria that cause food born illness. **Key Facts Bull**, p. 1, July 1996.

VANDERLINDE, P.BV., SHAY, B., MURRAY, J. Microbiological status of Australian sheep meat. **Journal of food Protection**, v.62, n.4, p.380-385, Apr. 1999.

VIEIRA, S: **Estatística experimental**. Ed. Atlas, São Paulo- SP, 1999, 192p.

WEAGANT, S., BRYANT, J. and BARK, D: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. **Journal of Food Protection**. n. 57, pp. 629-630, Jul., 1994.

WITTAN, T., WOLFE, M., WACHSMUTH, I., ORSKOV, F., ORSKOV, I. and WILSON, R: Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. **Infection Immunity**, n. 61, pp. 1619-1629, 1993.

ANEXOS

ANEXO 1

Questionário proposto para a análise higiênico-sanitária dos frigoríficos sob inspeção estadual em Pelotas

Nome do frigorífico:

Telefone:

Médico Veterinário responsável:

Proprietário:

Data da coleta:

Número de amostras:

I) Quanto ao estabelecimento:		
1) Pavimentação na área do frigorífico		
() Sim () Não		PAF ___
2) Local específico para lavagem de mãos e botas		
() Sim () Não		LMB ___
3) Escoamento da água de lavagem para sist. esgoto		
() Sim () Não		EALSE ___
3) Sanitários fora do prédio de abate		
() Sim () Não		SFP ___
4) Possibilidade de acesso de animais na linha de abate		
() Sim () Não		AALA ___
5) Aberturas com telas íntegras		
() Sim () Não		ATI ___
6) Portas ou telas de entrada com sistema "vai-vem"		
() Sim () Não		PSVV ___
7) Limpeza do piso na linha de abate		
() Boa () Ruim		LPLA ___
8) Quantificação limpeza do piso		QLP ___ %
9) Piso da sala de abate pavimentado		
() Sim () Não		PSAP ___
10) Integridade do piso da sala de abate		IPSA ___ %
11) Escoamento dos dejetos para sistema de esgoto		
() Sim () Não		EDSE ___
12) Paredes azulejadas		
() Sim () Não		PA ___
13) Integridade das paredes azulejadas		IPA ___ %
14) Presença de calha de sangria		
() Sim () Não		CS ___
15) Separação área suja X área limpa		
() Sim () Não		SASAL ___
16) Paredes com cantos arredondados		
() Sim () Não		PCA ___
17) Presença de vetores no interior da sala de abate (moscas, baratas, ratos...)		
() Sim () Não		VSA ___

18) Local separado para recebimento de vísceras () Sim () Não	LRV __
19) Sistema de fluxo linear de abate () Sim () Não	FLA __
20) Água de abastecimento municipal () Sim () Não	AAM __
21) Poço artesiano () Sim () Não	APOART __
22) Poço freático () Sim () Não	APOFRE __
23) A água recebeu algum tratamento? () Sim () Não	ATRATA __
24) De que material é o poço (1) Tijolos (2) Manilhas de concreto	MATPOÇO __
25) O poço é rebocado por fora? () Sim () Não	REBFORPOÇ __
26) O poço está localizado na parte mais alta do terreno, em relação às fontes de contaminação (esgoto, fossa, depósito de lixo, esterco, lavoura?) () Sim () Não	ALTAC __
27) O poço está localizado a pelo menos 45 metros das fontes de contaminação? () Sim () Não	DISTA __
28) O poço tem tampa? () Sim () Não	TAMPA __
29) A tampa é de alvenaria? () Sim () Não	TAMPALVE __
30) Como a água é retirada do poço? (1) Por gravidade (2) Com bomba (3) Com balde	RETIRA __
31) Controle microbiológico da água de abastecimento (1) trimestral (2) semestral (3) anual	CMAA __
II) Quanto aos animais	
32) Procedência País	
Estado	
Cidade	
33) Aspecto higiênico do lote (sujidade da lã) (1) Bom (2) Médio (3) Ruim	AHL __
34) Quantificação da resposta anterior	QRA _____ %
35) Lavagem dos animais antes do abate () Sim () Não	LAAA __
36) Comprimento do velo (1) Alto (2) Médio (3) Baixo	CV __
III) Quanto aos trabalhos na linha de abate	
37) Atordoamento () Sim () Não	ATDMT __
38) Troca e/ou esterilização de facas após sangria () Sim () Não	TFAS __
39) Com que intervalo? (%)	ITFAS _____ %
40) Tempo de sangria (1) < 30 s (2) 60 s (3) > 60 s	TS __

41) Esfola	
(1) Manual (2) Mecânica	ESFL __
42) Temperatura da água de esterilização das facas	
(1) < 83° C (2) > 83° C	
43) Quantidade de rompimento das vísceras durante a abertura do abdômen. (em números)	FRVAB __
44) Esterilização da faca após rompimento de vísceras	
(1) Sempre (2) esporádico (3) nunca	EFRV __
45) Toailete da carcaça após rompimento de vísceras	
() Sim () Não	TCARV __
46) Uso de água hiperclorada na lavagem da carcaça	
() Sim () Não	AHLC __
47) Lavagem da carcaça com pressão	
() Sim () Não	LCP __
48) Direcionamento do jato de água da lavagem da carcaça	
(1) De cima p/ baixo (2) De baixo p/ cima (3) Aleatório	DJALC __
49) Contato de uma carcaça com a outra após lavagem	
() Sim () Não	CCAL __
50) Condução das carcaças para a câmara de refrigeração através de roldanas	
() Sim () Não	CCCR __
51) Condução da carcaças para câmara de refrigeração em carrinhos	
() Sim () Não	CCCRC __
IV) Quanto aos manipuladores	
52) Uso de protetor para cabeça	
() Sim () Não	PPC __
53) Uso de botas de borracha	
() Sim () Não	UBB __
54) Uso de avental nas áreas de contato com a carcaça	
() Sim () Não	ACC __
55) Condições higiênicas do uniforme dos funcionários na linha de abate	
(1) Boa (2) Ruim	CHUT __
56) Aspecto geral da higiene pessoal dos funcionários na linha de abate	
(1) Bom (2) Médio (3) Ruim	AHGFLA __
57) Lavagem de mãos antes de entrar na sala de abate	
() Sim () Não	LMASA __
58) Porcentagem de funcionários que lavam as mãos antes de entrar na sala de abate	PFLMAA __ __ __ %
59) Lavagem de botas antes de entrar na sala de abate	
() Sim () Não	LBASA __
60) Porcentagem de funcionários que lavam as botas	PFLBAA __ __ __ %
V) Quanto a rotina do abatedouro	
61) Abate animais de outra espécie	
() Sim () Não	AAOE __
62) No mesmo dia	
() Sim () Não	AAOEMD __
63) Realiza higienização na troca de espécie animal para o abate	

<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	HTEA __

ANEXO 2

Fórmula para elaboração de 1000 mL de Ágar Conservação

Componente	Quantidade (gr)
Extrato de carne	3,0
Peptona	10
Cloreto de Sódio	8,0
Fosfato dibásico anidro	1,22
Agar-agar	15
Água destilada	1000 mL

ANEXO 3

TABELA 2: Média de contagem de microrganismos nas carcaças e na água e de concentração de cloro na água de lavagem das carcaças nos frigoríficos

Frigorífico	CT	CF	EC	MA	Cloro (mg.mL ⁻¹)
F1	7,26*	3,65*	2,21*	-	-
F2	6,73*	3,44*	2,25*	-	-
F3	39,85*	1,37*	0,77*	-	-
F4	0,92*	0,73*	0,65*	-	-
A1	23**	9,2**	9,2	343***	0
A2	1,1**	0**	0**	8***	0,9
A3	1,1**	1,1**	0**	2***	1,42
A4	5,1**	5,1**	5,1**	4***	1,05

CT = Coliformes totais; CF = Coliformes fecais; EC = *Escherichia coli*; MA = mesófilos aeróbios facultativos F1 = Frigorífico 1.; F2 = Frigorífico 2; F3 = Frigorífico 3; F4 = Frigorífico 4; A1 = amostra de água de lavagem de carcaça do Frigorífico 1; A2 = amostra de água de lavagem de carcaça do Frigorífico 2; A3 = amostra de água de lavagem de carcaça do Frigorífico 3; A4 = amostra de água de lavagem de carcaça do Frigorífico 4; * = NMP/cm²; ** = NMP/100mL; *** = UFC/mL

ANEXO 4

Resultado de CT e de *E. coli* pela metodologia Petrifilm™ e pelo método NMP

Nº amostra	Coliformes Totais		<i>E. coli</i>	
	NMP/cm ²	Petrifilm (UFC/cm ²)	NMP/cm ²	Petrifilm (UFC/cm ²)
1.1	1,8	0,2	1,8	0,2
1.2	1,8	1,8	0,42	1,8
1.3	0,8	0,8	0,3	0,4
1.4	0,5	1,2	0,08	0,6
1.4	22	4,6	0,56	3
1.6	0,8	0,6	0,14	0
1.7	1,8	2,8	0,4	0,4
1.8	0,8	1,2	0,8	0,4
1.9	4,8	1,6	0,8	0,8
1.10	1,8	0,8	1,8	0,2
2.1	4,8	2,2	1,8	1,2
2.2	9,2	5,0	1,8	2,6
2.3	9,2	2,5	0,22	1,2
2.4	9,2	6,6	4,8	3,6
2.5	4,8	2,6	1,8	1,6
2.6	4,8	5,4	4,8	3,6
2.7	1,8	5,0	0,14	4
2.8	0,8	3,8	0,3	1,2
2.9	1,5	5,4	0,18	0,8
2.10	22	4,4	0,14	2,4
3.1	1,8	0,6	0,3	0,4
3.2	4,8	1,4	0,4	1,4
3.3	0,46	0,2	0,08	0
3.4	0,8	1,8	0,18	0,4
3.5	0,46	0,6	0,08	0
3.6	0,8	0,4	0,3	0
3.7	0,3	1,8	0,18	0,6
3.8	4,8	4,8	1,8	4,8
3.9	0,46	2,0	0,18	0,8
3.10	0,18	1,0	0,8	0,4
3.11	0,46	0,2	0,8	0
3.12	0,18	0,8	0,18	0
3.13	0,14	0,2	0,08	0
3.14	0,46	0,8	0,08	0,2
3.15	0,46	0,6	0	0,2
3.16	0,08	4,6	0,22	0,4
3.17	0,42	1,0	0,08	0,8
3.18	0,86	2,2	0,18	0,2
3.19	0,46	2,4	0,46	1
3.20	0,18	3,0	0,08	0,4
3.21	1,86	0,4	0,46	0,2
3.22	0,86	0,2	0,08	0
3.23	0,46	1,0	0,14	0
3.24	0,46	1,4	0,18	0,4
3.25	220	2,6	0,46	2,8
3.26	4,8	1,6	0,08	0
Coliformes Totais			<i>E. coli</i>	
Nº amostra	NMP/cm ²	Petrifilm	NMP/cm ²	Petrifilm

		(UFC/cm ²)		(UFC/cm ²)
3.27	220	5,2	1,8	5,2
3.28	220	0,2	0,8	0
3.29	18,6	2,4	0	0,2
3.30	4,6	0,2	0	0
4.1	0,8	1	1,86	0,4
4.2	0,46	0,4	0,08	0
4.3	0,18	0	0,08	0,2
4.4	0,18	6,6	0	0
4.5	0,08	1,2	0,4	1
4.6	1,8	2	0,86	0,6
4.7	0,46	9,6	1,86	9,4
4.8	0,46	3,2	0,4	0,8
4.9	1,8	3	0,86	0,8
4.10	0,18	0,4	0,46	0