

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA LUISA BRANDÃO

**MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO EM UMA LINHA DE ABATE DE
BOVINOS MEDIANTE O EMPREGO DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES
DE HIGIENE E PESQUISA DE PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE
PÚBLICA**

CURITIBA

2011

JULIANA LUISA BRANDÃO

**MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO EM UMA LINHA DE ABATE DE
BOVINOS MEDIANTE O EMPREGO DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES
DE HIGIENE E PESQUISA DE PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE
PÚBLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Professor Doutor Luciano dos Santos Bersot.

CURITIBA

2011

Brandão, Juliana Luisa

Monitoramento microbiológico em uma linha de abate de bovinos mediante o emprego de micro-organismos indicadores de higiene e pesquisa de patógenos de importância em saúde pública / Juliana Luisa Brandão. – Curitiba, 2011.

74 f. : il.; graf., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot

1. Bovino de corte – Carcaças. 2. Microorganismos - Contaminação. I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Título.


CDD 664.929


JULIANA LUISA BRANDÃO

**MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO EM UMA LINHA DE
ABATE DE BOVINOS MEDIANTE O EMPREGO DE MICRO-
ORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE E PESQUISA DE
PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:


Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Campus Palotina, UFPR


Dr. HEITOR DAGUER
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)


Prof.^a Dr.^a MARIA LUCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 23 de fevereiro de 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a dois mestres que me incentivaram a seguir este caminho: Valmir Kowalewsky de Souza e Luiz César Panetta.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos concede o dom da vida, que ilumina nossos caminhos e nos dá força para superar os obstáculos encontrados.

Aos meus pais, Maurício e Néli, pelo exemplo de vida, pelo amor incondicional, pelo apoio em todas as horas e por serem absolutamente fantásticos.

Aos meus irmãos Luís Alexandre e Gil por todo amor, suporte técnico e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot, por me conceder a oportunidade de realizar este trabalho.

A Prof. Dra. Érica Cristina B. Guirro pela colaboração com a análise estatística.

Ao Prof. Henrique Soares Koehler, pelo apoio, paciência e imensa boa vontade.

Aos queridos companheiros do Laboratório de Controle Microbiológico de Água e Alimentos, do *Campus* Palotina da UFPR, por todo apoio e colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UFPR pela amizade e companheirismo.

À empresa que gentilmente contribuiu cedendo espaço para coleta de amostras para execução do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A você, Rafael, meu companheiro eterno, pelo amor incondicional e dedicação.

RESUMO

Os micro-organismos indicadores podem ser utilizados como método de avaliação da qualidade higiênico-sanitária de produtos alimentícios, assim como os patógenos *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* sp., indicando a adequação de condições de obtenção, processamento e armazenamento dos alimentos. O presente estudo buscou avaliar a contaminação superficial de carcaças bovinas e fezes de bovinos advindos de um matadouro-frigorífico sob inspeção federal no oeste do Paraná pelos indicadores mesófilos aeróbios (AC), enterobactérias (EB), coliformes a 35°C (CT) e *E. coli* (EC), bem como pelos referidos patógenos importância em saúde pública. Foram avaliadas amostras de 25 carcaças, cada uma em 4 pontos distintos do abate, por meio de *swabs* superficiais de carcaças e análises de fezes destas e de outras 25 carcaças adjacentes na linha de abate. As esponjas foram homogeneizadas e os homogeneizados resultantes foram submetidos análises microbiológicas dos micro-organismos indicadores, cujos resultados foram expressos em UFC/cm². Para a pesquisa dos patógenos foram realizadas análises de presença ou ausência de cada patógeno. No laboratório foram pesadas três frações de fezes de cada amostra em sacos estéreis para cada um dos patógenos investigados: *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* sp. e completado o volume com o caldo de enriquecimento referente ao micro-organismo pesquisado. As amostras superficiais de carcaças foram submetidas a diluições em escala decimal e incubadas em placas Petrifilm® para enumeração dos micro-organismos indicadores. Foram encontradas médias de 1,46, 0,3, 0,23 e 0,21 Log UFC/cm² para os indicadores AC, EB, CT e EC, respectivamente. Os valores encontrados situaram-se bem abaixo dos preconizados pela decisão 471/2001 da União Européia e de vários outros autores pesquisados, indicando a eficiência higiênica no processo da indústria. A utilização de grupos de indicadores mais específicos como os coliformes, enterobactérias e/ou *E. coli* mostraram-se bons na caracterização da contaminação ao longo do processo de abate, uma vez que a pesquisa destes pode fornecer informações mais concretas sobre a ocorrência de contaminações por fezes, contaminações cruzadas e presença de enteropatógenos, entre outros. Todas as amostras superficiais e de fezes foram negativas para os patógenos pesquisados, o que não deve permitir a redução dos níveis de alerta e controle rigoroso da qualidade, tanto da instância governamental quanto de toda a cadeia produtiva.

Palavras-chave: indicadores, micro-organismos, processamento, contaminação.

ABSTRACT

Indicators micro-organisms can be used as a method for evaluating the sanitary quality of food products, as well as the pathogens *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* sp., indicating the suitability of conditions for obtaining, processing and storage of food. This study sought to evaluate surface contamination of bovine carcasses and feces resulting from a slaughter plant under federal inspection in western Paraná by the indicators aerobic mesophilic (AC), *Enterobacteriaceae* (EB), coliforms at 35 ° C (CT) and *E. coli* (EC) as well as by those public health importance pathogens. Samples of 25 substrates, each at 4 different points of slaughter, using surface swabs of carcasses and analysis of faeces of these 25 bovines and other 25 adjacent carcasses on the slaughter line. The sponges were homogenized and the resulting homogenates underwent microbiological indicators of micro-organisms, and results were expressed in UFC/cm². For the research of the pathogens were analyzed for the presence or absence of each pathogen. In the laboratory three fractions of faeces were weighed from each sample in sterile bags for each of the pathogens investigated: *L. monocytogenes*, *E.coli* O157: H7 and *Salmonella* sp. and supplemented with the enrichment broth referring to the searched micro-organism. As carcass surface samples were diluted in decimal scale and incubated in Petrifilm® plates for enumeration of indicator micro-organisms. Averages of 1.46, 0.3, 0.23 and 0.21 log CFU / cm² were found for the for indicators AC, EB, CT and EC, respectively. The values to be found were well below those recommended by the decision 471/2001 of the European Union and several other authors surveyed, indicating the effectiveness of the hygienic process industry. The use of groups of more specific indicators such as coliforms, *Enterobacteriaceae* and *E. coli* proved to be good for the characterization of contamination throughout the slaughtering process, since the research can provide these more concrete information about the occurrence of contamination by fecal cross-contamination and the presence of pathogens, among others. All surface samples and faeces were negative for pathogens, which should not allow a reduction in the levels of alert and rigorous quality control of both the government body as a whole production chain.

Keywords: indicators, micro-organisms, processing, contamination.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	PRINCIPAIS ESPÉCIES ADMITIDAS PARA O GÊNERO <i>Salmonella</i> E SOROTIPOS.....	32
TABELA 2.	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS FERMENTATIVAS/ HEMOLÍTICAS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Listeria</i>	43
TABELA 3.	VARIAÇÃO MÉDIA DOS MICRO-ORGANISMOS INDICADORES (UFC/CM ²) NOS PONTOS AMOSTRADOS (A, B, C E D) AO LONGO DA LINHA DE ABATE DE BOVINOS.....	53

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE BOVINOS (PONTOS A e B) E CARÇAÇAS BOVINAS (PONTOS C e D, LADO EXTERNO E LADO INTERNO), COM INDICAÇÃO DOS PONTOS (*) ONDE FOI FEITA A COLETA DE AMOSTRAS SUPERFICIAIS EM ÁREAS DELIMITADAS DE 100 cm² (10cm X 10cm).....39
- FIGURA 2. CONTAGEM DE MESÓFILOS AERÓBIOS (AC) AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA (A, B, C e D) DURANTE A LINHA DE ABATE DE BOVINOS (Log UFC/.....47
- FIGURA 3. CONTAGEM DE ENTEROBACTÉRIAS (EB) AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA (A, B, C e D) DURANTE A LINHA DE ABATE DE BOVINOS (Log UFC/cm²).....49
- FIGURA 4. CONTAGEM DE COLIFORMES A 35°C (CT) AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA (A, B, C e D) DURANTE A LINHA DE ABATE DE BOVINOS (Log UFC/cm²).....50
- FIGURA 5. CONTAGEM DE *E. coli* (EC) AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA (A, B, C e D) DURANTE A LINHA DE ABATE DE BOVINOS (Log UFC/cm²).....52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABZC	Associação Brasileira de Criadores de Zebu
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
AC	Mesófilos aeróbios
ACTA	Proteína de superfície da célula bacteriana
ALOA	<i>Chromogenic Listeria Ottaviani and Agosti Agar</i> – Oxoid (Agar <i>Listeria</i> cromogênico Ottaviani e Agosti)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Associação Oficial dos Analistas Químicos)
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APT	Água peptonada tamponada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de tipos de culturas)
atm	Atmosfera terrestre
BP	Boas práticas
CDC	<i>Centers for Disease Control</i> (Centro de controle de doenças)
CT	Coliformes a 35°C
DIPOA	Departamento de inspeção de produtos de origem animal
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
DVA	Doenças veiculadas por alimentos
EB	Enterobactérias
EC	<i>Escherichia coli</i>
ETA	Enfermidade transmitida por alimentos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para a agricultura e alimentação)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Drogas)
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i> (Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos)
IMS	Separação imunomagnética
LIA	Lysine Iron Agar

SS	Meio <i>Salmonella-Shigelam</i>
MLCB	Agar manitol-lisina-cristal violeta-bile
MMWR	<i>Morbidity and Mortality Weekly Report</i> (Relatório semana de morbidade e mortalidade).
MSRV	Meio semi-sólido Rappaport Vassilidis
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS-TWEEN	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Tween (Solução salina tamponada – tween)
pH	Potencial de hidrogênio - refere-se a uma medida que indica se uma solução líquida é ácida (pH < 7, a 25°C), neutra (pH = 7, a 25 °C), ou básica/alcalina (pH > 7, a 25° C)
PPHO	Plano padrão de higiene operacional
ppm	Parte por milhão
RDC	Resolução da diretoria do colegiado
RNA	Ácido ribonucléico
SHU	Síndrome hemolítica urêmica
SIF	Serviço de Inspeção Federal
TCSMAC	Ágar MacConkey Sorbitol Telurito-Cefixime
TSB+N	<i>Trypticase Soy Broth</i> com Novobiocina (Caldo de enriquecimento soja trypticase)
TSI	<i>Triple Sugar Iron Agar</i> (Ágar triplo açúcar ferro)
UFC/cm ²	Unidades formadoras de colônia por centímetro quadrado
UFC/g	Unidades formadoras de colônias por grama
UFV	Universidade Federal de Viçosa
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)
VTEC	Verotoxigênicas
XLD	Xilose lisina desoxicolato ágar
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 OBJETIVO GERAL.....	13
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PRODUÇÃO MUNDIAL DE ALIMENTOS	14
2.2 CADEIA PRODUTIVA DE CARNE BOVINA	15
2.3 MICROBIOLOGIA DA CARNE.....	16
2.4 CONTAMINAÇÃO DURANTE O PROCESSAMENTO	18
2.5 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES.....	21
2.6. <i>Listeria monocytogenes</i>	23
2.7 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	27
2.8 <i>Salmonella</i> sp.55	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 LOCAL DE COLETA DE AMOSTRAS	36
3.1.1 INSTALAÇÕES E PROCESSO DE ABATE	36
3.2 COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS	38
3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	41
3.3.1 Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene	41
3.3.2 Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	41
3.3.3 Detecção de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	43
3.3.4 Detecção de <i>Salmonella</i> sp.....	44
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5 CONCLUSÕES	55

REFERÊNCIAS.....	56
------------------	----

1. INTRODUÇÃO

Na última década o Brasil multiplicou por dez o volume das exportações de carne bovina, representando, em 2006, 20% das exportações mundiais (FAO, 2009). Com isso, hoje o país ocupa a segunda posição no ranking mundial de produção de carne bovina atrás somente dos EUA que é o maior país exportador, à frente da Austrália e da Índia. (USDA, 2010). O Brasil produziu, em 2009, mais de 9 milhões de toneladas de carne, das quais exportou 1.390.000 (ABIEC, 2009).

Esse *status* foi atingido pelo perfil da pecuária de corte nacional e desenvolvimento de relações comerciais com antigos e novos parceiros importadores de cortes de carne bovina. A pecuária de corte no Brasil vem gerando lucros significativos todos os anos, além de empregos nos diversos setores envolvidos na cadeia de produção. A manutenção do comércio externo, entretanto, está diretamente ligada a exigências de qualidade e inocuidade, cada vez mais restritas e específicas de acordo com o país importador.

As exigências por qualidade e inocuidade da carne impulsionam o desenvolvimento de sistemas de controle de qualidade e higiene a serem aplicados em toda a cadeia de produção, a fim de garantir que os produtos finais possuam as características exigidas pelos parceiros comerciais e apresentem a qualidade e a inocuidade desejadas. A forma mais efetiva de se garantir que os produtos cárneos sejam produzidos de acordo com padrões internacionais de qualidade e inocuidade é pelo monitoramento de parâmetros de qualidade e higiene nas diferentes etapas da produção. Esses sistemas são amplamente utilizados pelas indústrias de alimentos, baseados na pesquisa sistemática de indicadores biológicos (micro-organismos indicadores de higiene) em pontos específicos da linha de produção de carne bovina. São bastante eficientes e possibilitam a adoção de medidas corretivas a fim de minimizar e ou evitar possíveis contaminações dos produtos.

A ausência de cuidados higiênico-sanitários que propicia a contaminação de alimentos tem sido motivo de preocupação de várias organizações e comissões internacionais, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF). Sua importância abrange questões

de natureza social, econômica, política e de saúde pública, chegando inclusive a representar problema de segurança nacional.

No caso dos Estados Unidos da América (EUA), a legislação exige a implantação de no mínimo um ponto crítico de controle (PCC) na linha de produção, permitindo que o controle dos perigos seja executado numa etapa posterior. Neste processo em particular, a legislação norte-americana sugere, mas não determina a introdução de procedimentos de descontaminação das carcaças, medida esta que não é admitida pela União Européia nem pelo Brasil. Para evitar o conflito de legislação, o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, ligado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) brasileiro tem recomendado aplicação da diretiva norte-americana de tolerância zero para contaminação gastrointestinal, criando no final no processo de abate a etapa de revisão de carcaças e estabelecendo-se nesta etapa um PCC que consiste na remoção da contaminação gastrointestinal visível (CIRCULAR nº463, 2004).

No Brasil, alguns aspectos que influenciam diretamente a posição competitiva são: a tecnologia (incluindo aspectos tecnológicos da pecuária, aspectos tecnológicos no abate/processamento e distribuição), a gestão dos sistemas de produção e distribuição, a rastreabilidade e certificação, as questões ambientais, sanitárias e de bem estar animal. Hoje, alguns desses aspectos são pontos cruciais para o crescimento da exportação (BRASIL, 2007).

Um dos aspectos onde grandes avanços podem ser observados ao longo dos últimos anos refere-se à qualidade e sanidade da carne. Os consumidores, que estão se tornando mais esclarecidos e exigentes, buscam por produtos de maior qualidade. Adicionalmente, a preocupação com os aspectos relacionados à saúde e bem estar das pessoas também tem aumentado consideravelmente. No caso específico das carnes, essa demanda acontece tanto pelos atributos intrínsecos da qualidade como maciez, sabor, teor de gordura, como também pelas características voltadas às formas de produção, processamento, comercialização, etc. (LUCHIARI FILHO, 2006).

A inocuidade dos alimentos como medida de proteção da saúde pública e promoção de desenvolvimento econômico continua sendo um importante desafio tanto nos países desenvolvidos quanto nos que estão em desenvolvimento. Em muitos países foram alcançados progressos consideráveis no fortalecimento dos sistemas de inocuidade de alimentos, o que coloca em evidência as oportunidades

de redução e prevenção das enfermidades veiculadas por estes. No entanto, continuam havendo taxas inaceitáveis desse tipo de enfermidade e novos perigos estão sendo introduzidos na cadeia produtiva de alimentos (FAO, 2007).

A incidência global de doenças transmitidas por alimentos (DTA) é difícil de estimar, mas há relatos de que apenas em 2005, 1,8 milhões de pessoas morreram de doenças diarréicas. Uma grande proporção dos casos pode ser atribuída à contaminação de alimentos e água potável. Além disso, a diarreia é uma das principais causas da desnutrição em lactentes e crianças. Nos países industrializados, a porcentagem da população que sofre de doenças veiculadas por alimentos a cada ano pode ser estimada em até 30%. Nos EUA, por exemplo, calcula-se que a cada ano ocorram cerca de 76 milhões de casos de DTA, resultando em 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes (CARMO *et al.*, 2005). No Brasil, a implantação do Serviço de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VEDTA) se deu em 1998, com início das notificações de surtos de DTA em 1999 (CARMO *et al.*, 2005). Até 2004, foram notificados ao Ministério da Saúde 3.737 surtos, com o acometimento de 73.517 pessoas e registro de 38 óbitos. Houve uma média de 684 surtos por ano, com uma mediana de sete doentes por surto, sendo 51% dos casos do sexo masculino (CARMO *et al.*, 2005). Cabe lembrar que o baixo número de surtos no Brasil é resultado do baixo número de notificações ao sistema, ainda em implantação.

Bean & Griffin (1990), citados por Tavares & Serafini (2003), estimaram um custo anual de 7,7 a 8,4 bilhões de dólares nos EUA para as doenças associadas ao consumo de carnes. No entanto, os principais jornais americanos citam um estudo recente de entidades ligadas ao consumidor juntamente com a universidade de Georgetown, considerado um total de 27 agentes patogênicos conhecidos – como *Salmonella* e *Listeria* – analisando todos os custos relacionados à saúde, que elevou o valor para 152 bilhões de dólares ao ano.

Nos processos industriais de abate de bovinos e processamento de carne, são utilizados micro-organismos indicadores de higiene, como aeróbios mesófilos e coliformes. Além desses indicadores, a pesquisa direta de micro-organismos patogênicos é fundamental para garantia da inocuidade de produtos cárneos. Dois patógenos frequentemente associados à carne bovina são: *Listeria monocytogenes* e cepas patogênicas de *Escherichia coli*, especialmente as verotoxigênicas (VTEC), com destaque à *E. coli* O157:H7 (DUFFY *et al.*, 2006). *Salmonella* sp. é também um

importante patógeno de origem fecal em carcaças. Esses patógenos são descritos como importantes causadores de DTA, associadas ao consumo de produtos de origem animal. A frequente presença desses patógenos em carne bovina se dá pela facilidade de contaminação durante o processamento, por diversas fontes.

Segundo Franco & Landgraf (2008), micro-organismos indicadores são grupos ou espécies de micro-organismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. Ainda segundo as autoras, devem ser de rápida e fácil detecção, distinguíveis da microbiota do alimento, não devem estar presentes como contaminantes naturais dos alimentos e devem estar sempre presentes quando o patógeno associado estiver, entre outras.

Devido a essas características dos micro-organismos indicadores, sua identificação não poderia deixar de ser realizada nesta pesquisa, uma vez que seus resultados fornecem indicações seguras de contaminação fecal, o que representa uma chance maior de se encontrar os patógenos pesquisados. A própria *E. coli* é um indicador de contaminação fecal, uma vez que é encontrada no conteúdo intestinal de animais de sangue quente, inclusive do ser humano. Entre os micro-organismos indicadores devem ser citados os mesófilos aeróbios (AC), os coliformes a 35°C (CT), Enterobactérias (EB), *Escherichia coli* (EC).

No caso dos testes para Contagem Total de Mesófilos e *Enterobacteriaceae*, exigências da Legislação da União Européia, há limites pré-estabelecidos, independentes da técnica de obtenção das amostras (enxágüe superficial para recuperação dos micro-organismos ou homogeneização da amostra – tecido – com destruição do mesmo).

Salmonella tem origem nos intestinos de aves, répteis e mamíferos em geral e chega aos humanos via produtos de origem animal, principalmente aves e ovos, mas também carne bovina, suína e leite, produzindo náusea, vômito, cefaleia, febre, cólica abdominal e diarreia. Com o intuito de reduzir os riscos relativos à saúde do consumidor, a legislação atual preconiza periódicas análises microbiológicas de alimentos, inclusive produtos cárneos, para avaliar as condições higiênico-sanitárias desses produtos e a presença de microrganismos patogênicos. Com relação à

Salmonella spp., para que um produto seja considerado adequado ao consumo, é exigida ausência em 25g de alimento (TRINDADE, 2004).

Salmonella sp. tem sido a principal bactéria patogênica incorporada à linha de abate pelo próprio animal de açougue, com registros alarmantes em todo o mundo. Por isso, o controle deste micro-organismo é importante, sobretudo em etapas anteriores ao abate, incluindo o transporte e o sistema de criação (SHINOHARA *et al.*, 2008).

E. coli O157:H7, por sua vez, entrou em evidência em 1982, quando começaram a ocorrer os surtos de colite hemorrágica em Oregon e Michigan (EUA). Mas foi em 1993, após um grande surto alimentar associado a hambúrgueres mal passados vendidos por uma cadeia de *fast food* nos EUA, que foi reconhecida como um patógenos de grande importância em alimentos (RANGEL, 2005).

Escherichia coli sorotipo O157:H7 causa um quadro agudo de colite hemorrágica, com produção de grande quantidade de toxina que provoca severo dano à mucosa intestinal. A doença é auto-limitante, com duração média de 5 a 10 dias. Estima-se que aproximadamente 15% das infecções por *E. coli* O157:H7, podem apresentar uma complicação chamada Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), caracterizada pela destruição das células vermelhas do sangue e falência renal (SÃO PAULO, 2000).

Listeria monocytogenes, agente etiológico da listeriose, é tida como agente patogênico para os animais desde 1926. Mas somente em 1980 é que passou a receber o devido interesse em saúde pública, quando sua importância dos alimentos na cadeia de transmissão da infecção ao homem foi reconhecida (GERMANO & GERMANO, 2008). Durante a década de 80 ocorreram vários surtos de listeriose. O primeiro deles, que despertou os microbiologistas de alimentos para o problema da *L. monocytogenes*, ocorreu no Canadá. O alimento incriminado foi salada de repolho tipo *coleslaw* (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes* pode ser tanto de natureza ambiental, considerando-se os reservatórios naturais do agente, quanto proveniente das próprias instalações agroindustriais. Nestas instalações, em particular, a bactéria, devido à elevada capacidade de resistência no solo, piso, ralos, superfícies, água e alimentos, multiplica-se com relativa facilidade, mesmo sob condições adversas. Esses fatos contribuem para que seja considerada um dos

micro-organismos patogênicos de grande preocupação para a indústria alimentícia (GERMANO & GERMANO, 2008).

Considerando a importância da carne bovina para a economia brasileira, estudos que sejam desenvolvidos na cadeia produtiva a fim de fornecer dados sobre a distribuição de micro-organismos indicadores e de patógenos de importância para a saúde pública ao longo da linha de abate de bovinos são fundamentais para contribuir com a implementação e manutenção dos procedimentos preventivos adotados pelas empresas, como os programas de boas práticas (BP) e do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – Sistema HACCP - garantindo a inocuidade microbiológica a esses produtos. A obtenção de produtos cárneos de qualidade e inócuos garante maior credulidade ao Brasil nesta importante cadeia produtiva, além de assegurar para a população produtos de alta qualidade e sanidade.

Observando, ainda, os estudos acerca da contaminação das carcaças bovinas durante o abate, como os estudos de Barros *et al.* (2007), que identificou os principais pontos de contaminação em indústrias de abate e processamento de carne, como embutideiras, superfícies da plataforma de abate, pisos e ralos, as pesquisas sobre contaminação de carcaças bovinas durante a produção (Alonso *et al.*, 2007) por *E.coli* O157:H7 e inúmeros outros, bem como impacto para a saúde pública que representam as DTA e a visibilidade dos patógenos *Listeria monocytogenes*, *E .coli* O157:H7 e *Salmonella* sp. na indústria de carnes, que o presente estudo justifica-se.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o processo tecnológico do abate e a inocuidade das carcaças obtidas por meio da quantificação dos principais micro-organismos indicadores de higiene e detecção dos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* sp. ao longo da linha de abate de bovinos de forma.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Enumerar os micro-organismos indicadores ao longo da linha de abate de bovinos;
- Investigar a presença de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* sp. em amostras superficiais de carcaças bovinas ao longo do abate e em amostras fecais ao longo do abate;
- Avaliar a prevalência dos micro-organismos indicadores de higiene durante pontos estratégicos durante o abate de bovinos correlacionando com as exigências da legislação brasileira e de países importadores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO MUNDIAL DE ALIMENTOS

O setor de produção de alimentos vive um desafio nesse início de século 21: produzir em quantidade suficiente para suprir a demanda mundial, certificando-se que os mesmos possuam qualidade e sejam seguros para o consumidor. Para se alimentar corretamente 6 bilhões de pessoas (suprimindo a subnutrição e a fome) seria necessário aumentar a produção agrícola e alimentar mundial, de imediato, em cerca de 30% (MAZOYER, 2003). Segundo dados da FAO (2009), a produção de alimentos terá que crescer 70% até 2050 para suprir as crescentes necessidades da população mundial.

Durante a segunda metade do século XX, a produção agrícola e de alimentos no mundo multiplicou-se por 2,6 vezes, crescendo um pouco mais rapidamente que a população, que passou ao mesmo tempo de 2,5 para 6 bilhões de pessoas. Infelizmente, o imenso progresso agrícola e alimentar também apresentou limites e contradições para esta população mundial (MAZOYER, 2003).

A demanda por alimentos deve continuar a crescer como resultado tanto do crescimento populacional quanto do aumento da renda nos países emergentes. A procura de cereais (para alimentação humana e animal) deve alcançar cerca de 3 bilhões de toneladas até 2050. A produção anual de cereais terá de crescer quase um bilhão de toneladas e a produção de carne mais de 200 milhões de toneladas, alcançando um total de 470 milhões de toneladas em 2050. Destas, 72% serão consumidas nos países em desenvolvimento, percentual que hoje é de até de 58% (FAO, 2009).

A menos que sejam tomadas medidas para corrigir e adequar os sistemas de produção e distribuição de alimentos, esse quadro tende a se agravar, já que se estima que a demanda por produtos de origem animal, por exemplo, triplique ou até mesmo quadruple nos próximos 30 anos (D'SILVA, 2000).

Fresco & Steinfeld (1998) indicam, no entanto, que esse cenário poderia ser ainda pior, se a produção de alimentos não houvesse aumentado nos últimos anos. Nos países em desenvolvimento, por exemplo, nas últimas duas décadas observou-se um aumento de 127% na produção de carne e 331% na de ovos. Mesmo assim, somente 22% da proteína da dieta é de origem animal, devido ao seu alto custo, enquanto nos países desenvolvidos esse valor é de 60%. Portanto, fica evidente a necessidade de aumentar essa cifra, especialmente nos países em desenvolvimento.

2.2 CADEIA PRODUTIVA DE CARNE BOVINA

No Brasil, a criação dos bovinos de corte é feita, basicamente, de maneira extensiva. Segundo dados do Instituto de Estudos Pecuários (IEPEC), dos 28 milhões de cabeças abatidas no país, aproximadamente 10% provêm de animais confinados (ANDRADE, 2009). Na criação extensiva brasileira, mesmo com a massiva seleção a que foi submetido parte do rebanho zebuino, o abate dos animais é tardio, nunca ocorrendo antes dos 24 meses de idade (SILVEIRA, 2001). Em 2008 o Brasil liderou o ranking dos maiores exportadores de carne bovina no mundo, somando o volume de 2,2 milhões de toneladas equivalente carcaça e receita cambial de US\$ 5,3 bilhões. Estes valores representaram uma participação de 28% do comércio internacional, exportando para mais de 170 países (ABIEC, 2009).

De janeiro a dezembro de 2009 o volume exportado foi de 1.245.139 toneladas equivalente carcaça, gerando receitas de US\$ 4.118.582 dólares. Esses valores representam quedas de 23% de receitas e de 10% em volume, em relação ao mesmo período do ano anterior (janeiro a dezembro de 2008) (ABIEC, 2009). Esta queda pode ser explicada, por um lado, pelos reflexos da crise econômica mundial e, por outro, pela restrição da carne brasileira no mercado europeu.

A carne bovina brasileira é exportada para mais de 170 países em diversas regiões do mundo como América Latina, Oriente Médio, Rússia, União Européia e África. Essa grande variação de mercados importadores impõe diferentes barreiras sanitárias, incluindo padrões de qualidade e higiene que devem ser atingidos. De forma geral, os cortes destinados ao mercado externo devem ser analisados quanto

à presença de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, o que pode limitar a comercialização desses produtos caso não sejam atingidos os diferentes critérios microbiológicos estabelecidos pelos países importadores, como os membros da União Europeia (EC, 2007).

É importante enfatizar que, para obtenção de um alimento inócuo, os cuidados devem ter início na fase primária de produção. Dentro deste contexto, sistemas como as BP e HACCP, apresentam-se como alternativas a serem empregadas já na produção primária, pois tem como fundamentos a prevenção dos perigos químicos, físicos e biológicos. Nos países desenvolvidos, já há uma mentalidade voltada para sua adaptação e implantação nas fazendas através de programas do tipo “*from farm to fork*”, que numa tradução livre seria a produção de alimentos seguros envolvendo todas as etapas de produção, isto é, “da fazenda ao garfo do consumidor” (CULLOR, 1995; JOHNSTON, 2000).

2.3 MICROBIOLOGIA DA CARNE

Os sistemas de controle de qualidade utilizados na produção de carne bovina levam em consideração diferentes parâmetros microbiológicos a fim de se verificar a qualidade e inocuidade final dos produtos obtidos. Vários micro-organismos indicadores são utilizados para esse fim, como os aeróbios mesófilos e coliformes. A União Europeia, por exemplo, determina a enumeração de aeróbios mesófilos e enterobactérias, além de pesquisa de *Salmonella* sp., em carcaças bovinas como medidas de verificação da qualidade microbiológica do processo de abate (EC, 2007). No Brasil, os padrões microbiológicos são seguidos de acordo com o mercado importador, e para o comércio interno os padrões são estabelecidos pela ANVISA, de acordo com a RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Doenças causadas por patógenos de origem alimentar constituem um problema de saúde pública mundial e sua prevenção é o objetivo de todas as sociedades. São doenças causadas por bactérias ou seus metabólitos, parasitas, vírus, algas ou toxinas. A importância das diferentes doenças de origem alimentar varia entre países dependendo do alimento consumido, dos procedimentos de processamento, preparação, manuseio e armazenamento dos alimentos e da

sensibilidade da população. Enquanto a completa eliminação das doenças de origem alimentar é inatingível, tanto os gestores governamentais de saúde pública quanto a indústria estão comprometidos em reduzir a incidência de doenças causadas por alimentos contaminados. Entretanto, a redução do número de casos tem sempre um custo para a sociedade. O termo “custo” compreende não apenas dinheiro, mas também considerações em relação à cultura e hábitos alimentares (ICMSF, 2006).

De uma maneira geral níveis de contaminação por aeróbios mesófilos abaixo de 10^5 UFC/cm² da carcaça indicam boas condições de higiene durante o abate. Contaminação de carnes em níveis acima de 10^6 UFC/cm² indica início de processo de deterioração, com produção de odores típicos e redução do “*shelflife*” (tempo de prateleira). Quando o nível de contaminação atinge valores da ordem de 10^7 UFC/cm² a formação de limosidade já é evidente (GILL, 1998). Adicionalmente, como a maioria dos patógenos se desenvolve em temperatura ambiente, quanto maior for a contagem de aeróbios mesófilos maior é a chance das carcaças estarem contaminadas por patógenos como *Salmonella* e *E. coli* (FRANCO & LANDGRAF, 2008). O modo mais eficiente de se reduzir a contaminação e o desenvolvimento microbiano em produtos cárneos é o estabelecimento de programas preventivos de controle de qualidade como BP e HACCP, que podem ser validados e verificados pela pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene que além de remeterem a práticas adequadas de processamento, também sugerem a presença de patógenos e micro-organismos causadores de deterioração (JAY, LOESSNER & GOLDEN, 2005).

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

A contagem de mesófilos aeróbios em placas é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos. Mesmo que os patógenos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações nas condições sensoriais do alimento, um número elevado de micro-organismos indica que o alimento é insalubre. Exceção deve ser feita aos alimentos fermentados (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Os EUA exigem a execução diária de testes microbiológicos para *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. em abatedouros, sendo este último executado sob a responsabilidade da inspeção oficial, na frequência de uma amostra para cada 300 carcaças ou fração. No caso da União Européia, os indicadores são: Contagem Total de Mesófilos e *Enterobacteriaceae*, colhendo-se 5-10 amostras por semana durante seis semanas consecutivas. Para os estabelecimentos credenciados à exportação para a União Européia e EUA, poderão ser realizados simultaneamente os testes para *E. coli* e *Samonella*, na forma prevista na legislação dos EUA, acrescidos da prova para contagem total de micro-organismos mesófilos, aplicando-se para este indicador a metodologia prevista Decisão 471/2001 da União Europeia (BRASIL, 2004).

Apesar de alguns micro-organismos indicadores sugerirem a presença de micro-organismos patogênicos, uma vez que a maior parte dos patógenos de importância em saúde pública são mesófilos (FRANCO & LANDGRAF, 2008), a pesquisa efetiva de patógenos é fundamental para garantia da segurança microbiológica de produtos cárneos e para evidenciar os riscos que estes produtos podem representar para os consumidores. Assim, patógenos frequentemente associados à carne bovina devem ser pesquisados e controlados na linha de abate e processamento, como *Listeria monocytogenes*, cepas patogênicas de *E. coli* e *Salmonella* sp.

2.4 CONTAMINAÇÃO DURANTE O PROCESSAMENTO

O tecido muscular de animais sadios é considerado, em situações normais, estéril, livre da contaminação de qualquer micro-organismo. Após o abate e em decorrência de várias operações envolvidas na obtenção final das carcaças e cortes,

a carne passa a apresentar uma microbiota bastante variável, uma vez que pode se tornar sujeita a contaminações provenientes de diferentes fontes. A contaminação microbiológica das carcaças bovinas ocorre principalmente durante o processamento e manipulação, como esfolagem, evisceração, processamento de cortes, embalagem, estocagem e distribuição dentro de um frigorífico e para pontos comerciais (GILL, 1998). A esfolagem se constitui em um ponto crítico do abate, tendo em vista as possibilidades de contaminação da superfície das carcaças a partir de micro-organismos existentes na pele, nos pêlos e cascos dos animais (LAMBERT *et al.*¹, 1991, citado por FONTOURA, 2006). Fezes são consideradas como as principais fontes de contaminação e podem atingir a carcaça por deposição direta, pela pele, ou por contato indireto com carcaças contaminadas, equipamentos, trabalhadores, instalações e ar (BORCH & ARINDER, 2002).

Felizmente, no que concerne aos bovinos, no Brasil, as contaminações durante o processo de obtenção de carcaças reduziram-se assim que os cuidados antes, durante e após o abate cercaram-se de técnicas mais atuais. Tais técnicas constituem-se de: maior atenção aos detalhes de construção, favorecendo a limpeza e a desinfecção dos currais; instituição de chuveiro de aspersão com drenagem constante; de cuidados na área de “vômito”, da esfolagem aérea e, muito particularmente, das técnicas de oclusão do reto, dos intestinos e do esôfago, da higienização das mesas rolantes e de evisceração (PARDI *et al.*, 1993).

Para diminuir a probabilidade de contaminação microbiológica de origem bacteriana durante a esfolagem e evisceração, o animal deve ser mantido em jejum e dieta hídrica antes do abate, além de receber um banho de aspersão com pressão de 3 atm, e concentração mínima de 5 ppm de cloro (BRASIL, 1998). Já na sala de abate logo após a insensibilização, na área de “vômito”, deve ser realizada uma lavagem da região perianal do animal, pois o mesmo será içado por um dos membros pélvicos, evitando assim o escoamento de fezes (FRANCO, 2010).

Grande parte da contaminação bacteriana da carcaça durante as operações de abate ocorre durante a esfolagem. A superfície da carcaça é contaminada principalmente pela pele. A carcaça, após a esfolagem, apresenta uma contagem total de micro-organismos na proporção quase constante de 0,3% do total de micro-

¹ LAMBERT, A. D.; SMITH, J. P.; DODDS, K. L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat. A review. **Food Microbiology**, v.8, n.4, p.267-97, 1991.

organismos da pele. As primeiras incisões e parte da esfola são realizadas com faca que pode contaminar a superfície da carcaça. Facas esterilizadas utilizadas para incisão e separação da pele podem adquirir, em toda lâmina, cerca de 7,0 Log UFC aeróbios mesófilos, 5,0 Log UFC esporos de *Bacillus* e psicrotóxicos e 3,0 Log UFC de *Enterobacteriaceae*; também é possível a detecção de *Salmonella* spp. Outras contaminações durante a esfolagem são provenientes do contato da superfície da carcaça com a pele já separada ou mãos dos operários (ROÇA, s.d., p. 04.)

Outra etapa de grande importância para a qualidade higiênico-sanitária da carne é a evisceração. A contaminação se dá mais comumente através da ruptura de porções do trato gastrointestinal por facas e/ou outros objetos perfuro-cortantes ou quando há extravasamento de conteúdo fecal via reto. Existe ainda uma terceira possibilidade de contaminação da carcaça via trato gastrointestinal, através da migração de micro-organismos do lúmen intestinal para a cavidade abdominal após a morte do animal, dependendo do tempo transcorrido entre o abate e a realização da etapa de evisceração. Adicionalmente, há que se considerar a contaminação oriunda do ambiente de processamento: piso, paredes, superfície de contato, facas, mãos, água, etc. (BERSOT, s.d., p. 02.).

Salmonella spp. é possivelmente o patógeno mais veiculado pela carne, considerando-se as estatísticas de DTA. Dentre vários fatores que podem ser citados, a população de *Salmonella* no rúmen e nas fezes de bovinos no momento do abate depende da alimentação e distância de transporte. O patógeno aumenta sua quantidade no rúmen devido à distância de transporte e ao maior contato dos animais com material fecal (ROÇA, s.d., p. 03.).

Muitos estudos sobre a qualidade microbiológica dos bovinos de corte têm mostrado que a contaminação da pele é fortemente correlacionada à contaminação da carcaça, o que é provável resultado de contaminação cruzada (inter e/ou entre carcaças) durante o processamento. O aumento da compreensão da variação na prevalência e carga contaminante de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 presentes na pele e carcaças bovinas durante o processamento é pré-requisito relevante para a análise de perigos e pontos críticos de controle na obtenção de carnes (BRICHTA-HARHAY *et al.*, 2008).

Rigobelo *et al.* (2008), realizaram uma pesquisa em abatedouros comerciais do Estado de São Paulo, onde foram coletadas amostras de carcaças bovinas em várias etapas do processamento. Em todas as amostras colhidas antes da

evisceração havia uma certa contaminação, que aumentou após a evisceração, indicando existência de contaminação nessa etapa. Entretanto, em todas as amostragens realizadas após a lavagem final das carcaças, houve redução da contaminação inicial, indicando eficiência higiênica durante o processamento.

2.5 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES

Para que um micro-organismo seja considerado um bom indicador de contaminação de origem fecal deve preencher vários requisitos, dentre os quais Franco & Landgraf (2008) destacam:

- Ter como hábitat exclusivo o trato intestinal do homem e de outros animais;
- Ocorrer em números muito altos nas fezes;
- Apresentar alta resistência ao ambiente extra-enteral;
- Haver técnicas rápidas, simples e precisas para sua detecção e/ou contagem;

Como exemplos de micro-organismos indicadores podem ser citados aqueles que, segundo a ICMSF, podem ser agrupados em:

1. Micro-organismos que não oferecem risco direto à saúde: contagem padrão de mesófilos, contagem de psicrotróficos e termófilos, contagem de bolores e leveduras;
2. Micro-organismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes a 35°C, coliformes fecais, enterococos, enterobactérias totais e *Escherichia coli*; (SILVA, 2002).

A contagem total de aeróbios mesófilos em placa, também denominada contagem padrão em placa (PCA), é o método mais utilizado como indicador geral de qualidade higiênico-sanitária dos alimentos. As bactérias aeróbias mesófilas são constituídas de espécies da família *Enterobacteriaceae*, dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, dentre outros (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001). As placas são incubadas a 35°C/48h, sendo que a grande maioria das bactérias mesófilas se multiplica nesta temperatura, incluindo os patogênicos e os deteriorantes (SILVA JÚNIOR, 1995). Todas as bactérias patogênicas de origem

alimentar são mesófilas. Portanto, uma alta contagem de mesófilos, que crescem à mesma temperatura do corpo humano, significa que houve condições para que estes patógenos se multiplicassem (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Altas contagens de mesófilos aeróbios ou facultativos em alimentos (acima de 10^6 UFC/g) indicam:

- Exposição à contaminação ambiental;
- Permanência por tempo prolongado em temperatura ambiente;
- Armazenamento em temperatura inadequada de refrigeração (SILVA JÚNIOR, 1995).

As enterobactérias compreendem um grupo de micro-organismos classicamente utilizados na determinação de contaminações causadas por fezes, por serem encontradas no intestino, mas também são encontradas em regiões extra-intestinais. São bacilos Gram negativos e estão amplamente distribuídos no solo, água, plantas e intestinos do homem e dos animais. Atualmente, alguns laboratórios preferem enumerar as bactérias pertencentes a esse grupo ao invés de enumerar coliformes fecais e *E. coli*, por considerarem as bactérias do grupo coliforme mal distribuídas taxonomicamente, pela possibilidade de ocorrência de números falsos pela identificação apenas de grupos fermentadores de lactose e pela maior resistência das cepas de *Salmonella* em detrimento à *E. coli* e outros coliformes (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Os coliformes fazem parte da família *Enterobacteriaceae* e têm várias características em comum com espécies do gênero *Salmonella* e *Shigella*, das quais todas são patogênicas. Entretanto, a principal diferença bioquímica característica é que os coliformes fermentam a lactose com a produção de ácido e gás, enquanto *Salmonella* e *Shigella* não (PELCZAR JR.; CHAN; KRIEG, 1997). São bacilos Gram negativos e não formadores de esporos. Além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal como *Salmonella* e *Shigella*. Conseqüentemente, segundo Franco & Landgraf (2008), a presença de coliformes a 35°C no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos.

A definição de coliformes fecais é a mesma dos coliformes a 35°C, com a diferença de que os primeiros são capazes de fermentar lactose e produzir ácido e gás quando incubados a 44°- 45,5°C por 24-48h conforme descreve Silva (2002).

Nessas condições, ao redor de 90% das culturas de *E. coli* são positivas, enquanto entre os demais gêneros, apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm essa característica (FRANCO & LANDGRAF, 2008). São indicadores sanitários por indicarem uma possível presença de micro-organismos patogênicos e também devido à existência de sorotipos patogênicos de *Escherichia coli*. São também denominados COLIFORMES TERMOTOLERANTES ou COLIFORMES A 45°C (SILVA JÚNIOR, 1995).

A pesquisa de coliformes fecais ou de *E.coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos. (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

2.6 *Listeria monocytogenes*

Há muito tempo *Listeria monocytogenes* é reconhecida como um importante patógeno que pode estar presente nos alimentos. Vários surtos de listeriose ocorridos entre 2006 e 2007 nos EUA, atribuídos ao consumo de produtos cárneos prontos para consumo, levaram a uma maior preocupação do setor público e reguladores e, conseqüentemente, as atividades de avaliação e gestão do risco de *L. monocytogenes* receberam alta prioridade nas agências governamentais e na indústria neste país (FAO, 2007).

Embora sendo mais prevalente em países de clima frio e temperado do que em países tropicais, a ocorrência de casos de listeriose em suas formas neurológicas ou abortivas tem aumentado consideravelmente no Brasil nos últimos 25 anos (SCARCELLI & PIATTI, 2002), o que deve servir de alerta para que sejam intensificadas as pesquisas visando minimizar os seus efeitos deletérios, através da prevenção da contaminação de carcaças no processamento do abate. Entretanto, não há relato de DTA provocada por *L. monocytogenes* no Brasil até o presente momento.

L. monocytogenes é um importante patógeno de origem alimentar responsável por causar surtos de listeriose, doença zoonótica grave que pode afetar

seres humanos e muitas espécies de animais. Os principais sintomas clínicos de infecções por *L. monocytogenes* em humanos são o aborto, septicemia e meningite (GANDHI & CHIKINDAS, 2007). Estes sintomas ocorrem na doença invasiva e se manifestam naqueles indivíduos considerados “grupos de risco” para a doença, por serem predisponentes à listeriose adulta com altas taxas de mortalidade, incluindo: portadores de neoplasias, AIDS, alcoolismo, diabetes (principalmente a tipo I), doenças cardiovasculares, idosos (acima de 65 anos) e crianças (abaixo de 5 anos), gestantes, transplantes renais e terapias com corticóides (JAY, 2005). Enfatize-se que *L. monocytogenes* tem sido isolada de alimentos como leite e produtos lácteos, hortaliças, cortes de carne embalados a vácuo, frangos e carnes em geral (DESTRO; SERRANO; KABUK, 1991; SAKATE *et al.*, 2003; BERSOT *et al.*, 2008;). Surto de listeriose mostram uma correlação entre a infecção e a ingestão de alimentos, principalmente produtos lácteos contaminados com *L. monocytogenes* (GUERRA & BERNARDO, 2004). Há, ainda, a listeriose não invasiva, cuja característica principal é uma gastroenterite febril, não acometendo grupos específicos da população (SCHLECH, 1997).

Alguns estudos sugerem que até 21% dos humanos sejam portadores desta bactéria nos intestinos (SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROOME, 1991; MASCOLA *et al.*, 1992; SLUTSKER & SCHUCHAT, 1999). Esse patógeno tem sido encontrado mundialmente em pelo menos 42 espécies de mamíferos, tanto domésticos quanto silvestres, assim como em pelo menos 22 espécies de pássaros e em algumas espécies de peixes e moluscos (USDA, 1991; SLUTKER & SCHUCHAT, 1999; ROCOURT, JACQUET & REILLY, 2000; DESTRO, 2000). *L. monocytogenes* é um micro-organismo ubíquo, podendo ser isolado do solo, água, silagem, plantas e outras fontes ambientais. Esta bactéria é bem resistente e suporta os efeitos deletérios do congelamento, secagem, acidez e calor, mesmo não sendo formadora de esporos (CLIVER, 1990; PERRY & DONNELLY, 1990; PELL, 1997; SLUTSKER & SHUCHAT, 1999; DYKES & MOORHEAD, 2000).

Uma evidente característica de *L. monocytogenes* é sua habilidade em sobreviver e multiplicar dentro da célula eucariótica bem como induzir a infecção célula-célula. Os genes responsáveis pelo ciclo intracelular estão localizados no cromossomo, entre o *locus* *prs* e *ldh*, o qual é referido como LIPI-1 (“*Listeria pathogenicity island 1*”) (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Outros fatores também são descritos como importantes para os mecanismos de patogenicidade de *L.*

monocytogenes. A proteína de superfície ActA conduz o micro-organismo para as fibras de actinas e finalmente a conexão com a outra célula hospedeira e mediada pelas internalinas (CABANES *et al.*, 2002). Dentro da família das internalinas já foram identificadas em *L. monocytogenes* a proteína InIA, a qual possui função de invasão através da interação com receptores de caderina em células epiteliais (LECUIT *et al.*, 2001), entre outras.

L. monocytogenes tem sido associada com alimentos tais como leite cru, leite supostamente pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, embutidos de carne, frango cru e cozido, carne crua e peixes crus ou defumados. Sua habilidade de se desenvolver em temperaturas tão baixas quanto 3°C, permite sua multiplicação em alimentos refrigerados (RORVIK & YNDESTAD, 1991; SANAA *et al.*, 1993; NORRUNG, ANDERSEEN, SCHLUND, 1999; PETERSEN & MADSEN, 2000; DESTRO, 2000; BERSOT *et al.*, 2008). Nos EUA onde há uma rede eficiente de monitoramento de DTA, estima-se que ocorram pelo menos 1600 casos de listeriose por ano, segundo dados do CDC até 2008, com 415 mortes. A alta incidência torna a *L. monocytogenes* um dos 5 patógenos que mais causam mortes nos EUA, sendo responsável por 28% do total de óbitos causados por doenças de origem alimentar no país (MEAD *et al.*, 1999). Ainda segundo dados do CDC, a incidência anual de listeriose diminuiu 34% entre 1989 e 1993 e uma análise da tendência da incidência 1996-2006 revelou um declínio de 36%. No entanto, os surtos continuam a ocorrer. Em 2002, um surto que resultou em 54 doenças, 8 mortes, e três óbitos fetais em 9 estados foi investigado apontando o consumo de carne de peru contaminado como o responsável.

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

Animais alimentados com silagem contaminada podem ser portadores assintomáticos e disseminar a contaminação no rebanho, assim como no leite (PERRY & DONNELLY, 1990; MANZANO *et al.*, 1998; BOVILL *et al.*, 2000). Em

Vermont, EUA, Perry & Donnelly (1990), detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 2,9% de amostras de silagem. Na Escócia, Fenlon (1985) encontrou 2,5% das amostras examinadas de silagem em 1983, e 5,9% das amostras em 1984 contaminadas por *L. monocytogenes*.

O confinamento dos animais pode favorecer a disseminação de *Listeria* spp. e de outros micro-organismos patogênicos no rebanho. Num estudo realizado em Nebraska, EUA, com bovinos confinados, detectou-se uma média de 22% de fezes de animais contaminadas com *Listeria* spp., sendo 2,2% positivos para *L. monocytogenes*, estando os animais clinicamente sadios (SIRAGUSA; DICKSON; DANIELS, 1993). Outro levantamento da presença de *L. monocytogenes* em fezes de bovinos abatidos na Iugoslávia mostrou que 24% das amostras foram positivas para essa bactéria. Neste mesmo trabalho, a prevalência de *L. monocytogenes* em carne moída foi de 69% (BUNCIC, 1991).

Com relação à listeriose causada por ingestão de produtos cárneos contaminados, o primeiro surto comprovado envolveu um tipo de patê importado pelo Reino Unido com 366 doentes e 63 mortes (MCLAUCHLIN *et al.*, 1991), e o primeiro relato nos Estados Unidos foi de um caso esporádico relacionado ao consumo de embutido de carne de peru, por um paciente com câncer (MMWR, 1989). Uma grande variedade de carnes e produtos cárneos, além de plantas de processamento, tem sido associada à contaminação por *L. monocytogenes* (NESBAKKEN; KAPPERUD; CAUGANT, 1996; NORRUNG, ANDERSEEN & SCHLUND, 1999; CORDANO & ROCOURT, 2001; PECCIO *et al.*, 2003; BARBALHO *et al.*, 2005; GUDBJORNSDOTTIR *et al.*, 2004; BARROS *et al.*, 2007).

Norrung, Anderseen & Schlund (1999) verificaram, na Dinamarca, uma taxa de 12,3% de *L. monocytogenes* em carne crua e 23,5% em carne processada. Um grande levantamento sobre a presença de micro-organismos patogênicos em carcaças de bovinos abatidos nos EUA foi realizado entre dezembro de 1993 e novembro de 1994 pelo serviço federal de inspeção de alimentos daquele país. Verificou-se que 238 (11,3%) das 2.112 carcaças analisadas apresentaram *L. monocytogenes* como contaminante (USDA, 1996a).

A eliminação de *L. monocytogenes* em ambientes de indústrias de alimentos é sabidamente difícil pela sua conhecida resistência a agentes antimicrobianos e substâncias químicas, como ácidos e álcalis. A capacidade de adesão e consequente formação de biofilmes são consideradas como principais fatores de

persistência de *L. monocytogenes* em indústrias de alimentos (HOOD & ZOTTOLA, 1995; DYKES & MOORHEAD, 2001; DYKES, 2003; TAKHISTOV & GEORGE, 2004; MORETRO & LANGSRUD, 2004). Esse micro-organismo possui comprovada capacidade de adesão em superfícies de diferentes tipos de materiais, como borracha, plástico, vidro e aço inoxidável, frequentemente utilizados em utensílios e equipamentos nessas indústrias (BERESFORD, ANDREW & SHAMA, 2001; GANDHI & CHIKINDAS, 2007).

2.7 *Escherichia coli* O157:H7

E. coli é uma espécie de bactéria pertencente à microbiota autóctone do trato digestivo de mamíferos e aves. Entretanto, algumas cepas possuem potencial patogênico e causam distintas síndromes diarréicas, e são divididas em diferentes grupos considerando suas propriedades virulentas, síndromes clínicas, epidemiologia e diferentes sorogrupos (JAY, LOESSNER & GOLDEN, 2005). Dentre os possíveis tipos de *E. coli* patogênicas, as cepas verotoxigênicas (VTEC) possuem grande importância epidemiológica por uma grande quantidade de sorogrupos serem comensais em bovinos e causarem severa enfermidade em seres humanos, particularmente creditada ao sorogrupo O157, associado ou não ao sorogrupo H7 (SYNGE, 2000). Porém, vários outros sorogrupos são sabidamente potenciais produtores de verotoxinas e são associados às infecções esporádicas e surtos em humanos (COIA, 1998).

Segundo Silva, Junqueira & Silveira, (2001), *E. coli* O157:H7 é reconhecida como patógeno de origem alimentar desde 1982, respondendo por milhares de casos de diarreia e síndrome urêmica hemolítica (HUS) nos EUA, Europa e Japão. A *E. coli* é um bacilo Gram negativo, não esporulado, pertencente à família *Enterobacteriaceae* e capaz de fermentar glicose com produção de ácido e gás (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Os grupos sorológicos virulentos de *E. coli* são diferenciados com base nas características das doenças que provocam e no efeito em certas culturas de células. Os cinco grupos virulentos reconhecidos são: *E. coli* enteroagregativas, entero-hemorrágicas, enteroinvasivas, enteropatogênicas e enterotoxigênicas (JAY, 2005). Vários fatores têm sido associados à virulência da *E.*

coli O157:H7, incluindo a produção de pelo menos uma das duas shigatoxinas, intimina e enterohemolisina (BARKOCY-GALLAGHER *et al.*, 2001, JAY, 2005).

As linhagens entero-hemorrágicas de *E. coli* produzem uma potente toxina, semelhante à toxina Shiga (verotoxina) produzida pela *Shigella dysenteriae* (JAY, 2005). As shigatoxinas (stx) são fatores de virulência essenciais na patogênese de VTEC (*E. coli* produtoras de verotoxinas). Dois tipos de stx são conhecidas: stx1 e stx2 (STROCKBINE *et al.*, 1988).

Segundo Chang *et al.* (2004), a diarreia associada à HUS é uma das principais causas de insuficiência renal aguda em crianças. Segundo os autores, vários estudos têm demonstrado que a *E. coli* O157 é o agente etiológico mais comum em casos de diarreia associada à HUS. Nos EUA, *E. coli* O157:H7 é o principal sorotipo produtor de toxinas “Shiga”, causando aproximadamente 73.480 casos de infecção e 61 mortes a cada ano. Razzaq (2006) afirma que 3 a 15% dos pacientes com diarreia por *E. coli* O157:H7 podem desenvolver a HUS e que o uso de antibióticos ou antidiarréicos nas fases iniciais da diarreia demonstrou aumentar o risco de HUS, porque o intestino está exposto a um maior número de toxinas por um longo período, devido à desaceleração da motilidade intestinal.

A intimina é outro importante fator de virulência codificado pelo gene *eae* essencial para adesão de VTEC aos enterócitos (KAPER *et al.*, 1998). Este gene já foi detectado em diversos sorotipos das VTEC e tem sido mostrado envolvido nos mecanismos de colonização em modelos animais (DONNEMBERG & KAPER, 1991). Segundo Jay (2005), a intimina é necessária para que as proteínas do citoesqueleto das células hospedeiras envolvam as células bacterianas aderidas, sendo de grande importância para colonização do organismo hospedeiro.

As enterohemolisinas são também reconhecidas como fatores de virulência das VTEC. São assim classificadas por causarem hemólise em eritrócitos de ovinos. São sintetizadas como protoxinas que requerem processamento específico para a sua ativação e formação de poros na membrana dos eritrócitos (COOKSON *et al.*, 2002). A presença desta classe de toxina é frequentemente encontrada nos sorotipos O157:H7 e O111:H- (SCHMIDT, BEUTIN & KARCH, 1995; SCHMIDT & KARCH 1996). Relacionada à síndrome urêmica hemorrágica, amostras de soro de pacientes comumente possuem anticorpos direcionados às hemolisinas das cepas da O157:H7 (SCHMIDT, BEUTIN & KARCH, 1995).

Os bovinos são considerados os principais veiculadores de VTEC, uma vez que os animais infectados raramente apresentam sintomas evidentes e eliminam os micro-organismos continuamente pelas fezes, contaminando o ambiente e os alimentos produzidos (PHILLIPS, 1999).

A transmissão de VTEC para seres humanos pode ocorrer de diferentes formas, como por contato direto com bovinos que estão eliminando esses micro-organismos, ou por consumo de alimentos e água contaminados. Essa forma é a mais comum de transmissão, frequentemente descrita em casos e surtos de infecções por VTEC (SYNGE, 2000, JAY, 2005). Os alimentos mais associados à transmissão de VTEC são: carne bovina mal passada, leite cru, queijos feitos com leite cru, vegetais crus (contaminação cruzada) e produtos cárneos fermentados (BLACKBURN & MCCARTHY, 2000).

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

Vários trabalhos relatam a presença de VTEC em produtos cárneos. Carney *et al.* (2006) observaram uma frequência de 2,4% de VTEC em cortes bovinos, com a maioria dos isolados apresentando importantes genes associados à patogenicidade. Chapman *et al.* (2001) verificaram a presença de *E. coli* O157 em um estudo desenvolvido ao longo de um ano na Inglaterra, e isolaram o patógeno em 12,9% dos bovinos, 1,4% das carcaças e em 0,44% dos produtos cárneos, com maiores frequências e contagens acima de 10^4 UFC/g entre os meses de julho e agosto. Maden *et al.* (2001), em estudo realizado na Irlanda do Norte, não isolaram *E. coli* O157:H7 em nenhuma das carcaças bovinas analisadas. Fantelli & Stephan (2001) detectaram a presença de cepas de *E. coli* em 2,3% de amostras de carne picada na Suíça, que apresentavam os genes *stx1* e *stx2*. Tutenel *et al.* (2003) detectaram *E. coli* O157 em carcaças bovinas e em amostras de carne moída, apresentando vários genes associados à patogenicidade. Em estudo realizado no Brasil e Argentina (GUTH *et al.*, 2003), a maioria dos isolados de *E. coli* verotoxigênicas apresentaram o gene *stx2*, com diferenças no potencial patogênico considerando os sorotipos e genótipos.

Silva *et al.* (2001), analisaram 340 amostras de produtos cárneos, não sendo detectada a presença de *E.coli* O157:H7 em nenhuma das amostras analisadas. Esses resultados, segundo os autores, complementam outros já previamente relatados para produtos cárneos no Brasil, atestando, senão a ausência, pelo menos uma baixa frequência do patógeno em nossa produção.

Broseta *et al.* (2001), em um trabalho de revisão cujo objetivo foi entender as primeiras fases da infecção em animais e humanos e preparar medidas de controle efetivas para a redução do risco da infecção por O157:H7 em seres humanos, analisaram criticamente os resultados de 26 estudos epidemiológicos publicados sobre a prevalência da contaminação do gado por cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas (VTEC), do sorogrupo O157:H7. Estes inquéritos foram realizados desde 1986 em fazendas na América do Norte (10 estudos), em fazendas na Europa (6 estudos) e nos matadouros, antes ou logo após o abate (7 estudos) ou após a esfolagem e evisceração (3 trabalhos). Foi argumentado que a prevalência dos valores inferidos a partir das medições realizadas nas pesquisas foram muito provavelmente subestimadas devido a amostragens insuficientes e métodos de inadequada sensibilidade de detecção (com exceção à técnica de separação imunomagnética). Não houve conclusões definitivas quanto à influência da localização geográfica ou época do ano na prevalência da contaminação. Nas pesquisas realizadas, observou-se a falta de avaliação da influência quantitativa dos níveis de higiene dos matadouros nas enumerações de *E. coli*. Além disso, há crescentes evidências de outras fontes de *E. coli* O157:H7 para bovinos nas fazendas, tais como alimentos, água e bebedouros de água.

Em outra revisão, sobre gestão quantitativa dos riscos inerentes à presença de *E. coli* O157: H7 em carne bovina, Duffy *et al.* (2006), concluíram que todos os experimentos com modelagens para previsão da incidência de *E. coli* O157:H7 podem sofrer variações em suas previsões da enfermidade, influenciadas pelas diferentes concentrações e prevalência de *E. coli* em regiões geográficas diversas. Ressaltaram, ainda, que qualquer um dos modelos poderia ser adaptado e executado com a adaptação dos dados de entrada / práticas de outros países ou regiões para avaliar e gerir os riscos apresentados por *E. coli* O157: H7 na carne.

O estudo de Duffy *et al.* (2006), relatou, ainda, que apesar das previsões de risco serem diferentes, houve uma acentuada similaridade de todos os modelos em termos de fatores de maior impacto de risco. Quatro dos cinco modelos

demonstraram que o fator com maior impacto sobre a doença foi a concentração do patógeno nas fezes ou pele dos animais no abate. Por isso, consideraram provável que os esforços destinados a eliminar os animais portadores em níveis muito elevados do patógeno na entrada da cadeia produtiva da carne renderiam bom retorno em termos de redução de risco. De forma similar, o abuso de temperatura no varejo também apresentou alta em incidência nos fatores de risco dos modelos.

No norte da Itália, um estudo foi conduzido por Alonso *et al.* (2007) a fim de determinar a presença de *E. coli* O157:H7 em fezes de bovinos abatidos e a posterior contaminação das carcaças durante o abate. De 45 amostras de fezes analisadas, 11 (24%) foram positivas para *E. coli* O157:H7. De 45 carcaças, 5 apresentaram positividade para O157:H7. Os resultados da análise molecular mostraram que o mesmo tipo de perfil fagotípico de *E-coli* O157:H7 foi detectado nas amostras de fezes e na carcaça de um animal, e também em mais duas carcaças correspondentes a dois animais abatidos no mesmo dia.

2.8 *Salmonella* sp.

Salmonella é um bastonete Gram negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae* não formador de esporos, móvel pela produção de flagelos peritríquios, exceção feita aos sorotipos Pullorum e Gallinarum, Está amplamente distribuída na natureza e têm os humanos e os animais como seus principais reservatórios. Doenças alimentares causadas por *Salmonella* resultam da ingestão de alimentos contendo um número significativo de determinadas linhagens do gênero (JAY, 2005).

Segundo sistema Kauffman-White de classificação, são conhecidos atualmente 2.541 sorotipos (ou sorovares) de *Salmonella* distribuídos em duas espécies conforme indicado na Tabela 1 (POPOFF, BOCKEMÜHL & GHEESLING, 2004), contudo cerca de 80 a 90 são os mais comuns nos casos de infecção dos seres humanos e animais. Dentre esses, alguns podem infectar as aves, sendo os mais comuns *S. Typhimurium*, e *S. Enteritidis* causando ou não o paratifo aviário, e através dos produtos alimentícios de origem avícola, associados com casos de DTA em seres humanos (BERCHIERI JÚNIOR & MACARI, 2000).

Tabela 1. Principais espécies admitidas para o gênero *Salmonella* e sorotipos.

Espécies	Nº de sorotipos
<i>Salmonella enterica</i>	
subsp. <i>enterica</i>	1.504
subsp. <i>salamae</i>	502
subsp. <i>arizonae</i>	95
subsp. <i>diarizonae</i>	333
subsp. <i>houtenae</i>	72
subsp. <i>indica</i>	13
<i>Salmonella bongori</i>	22
TOTAL	2.541

FONTE: POPOFF, BOCKEMÜHL & GHEESLING (2004).

Embora o hábitat primário da *Salmonella* spp. seja o trato intestinal de animais, como pássaros, répteis, animais de granja, homem e ocasionalmente insetos, a *Salmonella* pode ser encontrada, de tempos em tempos, em outras partes do corpo. Como forma intestinal, os micro-organismos são excretados nas fezes, das quais podem ser transmitidos por insetos e por outros organismos vivos para um grande número de localidades. Dessa forma, *Salmonella* pode ser encontrada na água, especialmente em águas poluídas (JAY, 2005).

A nomenclatura da *Salmonella* é controversa, uma vez que a taxonomia original do gênero não foi baseada nas relações de DNA; os nomes foram dados de acordo com as considerações clínicas, por exemplo: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Cholerasuis, *Salmonella* Abortus ovis e assim por diante. Quando as análises sorológicas foram adotadas no esquema Kauffmann-White em 1946, uma espécie das *Salmonella* foi definida como “um grupo fagotípico relacionado à fermentação”, resultando na consideração de cada sorotipo de *Salmonella* como uma espécie. Sendo a especificidade de hospedeiro sugerida pelos nomes anteriormente inexistentes (por exemplo, *S. Typhimurium*, *S. Cholerasuis* são, na verdade, ubíquos), nomes derivados da área geográfica original de isolamento inicial das primeiras cepas dos sorotipos recém descobertos foram escolhidos: *S. London*, *S. Panama*, *S. Stanleyville* (TODAR, 2008).

Embora ainda existam divergências sobre as denominações sorotipo e sorotipo, bem como sobre a melhor forma de apresentar um resultado, empregando

nomes ou fórmulas antigênicas, alcançou-se um consenso, de que todos os sorotipos ou sorotipos de *Salmonella* pertencem a duas espécies: *Salmonella bongori*, a qual contém 22 sorotipos e *Salmonella enterica*, a qual contém 2.519 ou mais sorovares, divididos em 6 subespécies:

- *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (I ou 1);
- *Salmonella enterica* subespécie *salamae* (II ou 2);
- *Salmonella enterica* subespécie *arizonae* (IIIa ou 3a);
- *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb ou 3b);
- *Salmonella enterica* subespécie *hotenae* (IV ou 4);
- *Salmonella enterica* subespécie *indica* (VI ou 6); (D'AOUST, 1997).

O Instituto Adolfo Lutz em São Paulo e a Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro são os dois laboratórios de referência que atualmente caracterizam os sorotipos de *Salmonella* sp. (REIS & CAMARGO, s.d., p. 01).

Embora todos os sorotipos de *Salmonella* tenham o potencial de causar a doença, alguns sorotipos parecem ser responsáveis por uma série de doenças em diversos animais e hospedeiros humanos. *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis* e *S. Newport* estão no topo da lista de sorotipos de *Salmonella* envolvidas em infecções humanas e *S. Dublin* é uma causa comum de infecções por *Salmonella* em bovinos (JACKSON, 2007).

Salmonella é um micro-organismo frequentemente associado a graves surtos de DTA no Brasil e no mundo. Na Inglaterra e países vizinhos, 90% dos casos de DTA estão associados à bactéria. Dados publicados em diversos países indicam o aumento dos relatos de casos (FRANCO & LANDGRAF, 2008), com hospitalizações e mortes em pacientes mais suscetíveis. Os veículos mais comuns dos surtos salmonelose humana são a água e os alimentos contaminados com fezes de animais ou humanos, cremes doces (tortas), maioneses, carne moída, lingüiças, ovos e carnes de aves, suínos e bovinos. As carnes suína e bovina são responsáveis por cerca de 13% dos surtos de salmoneloses humanas (MEAD *et al.*, 1999).

Jay (2005) relata que os sorotipos isolados com maior frequência nos EUA, de 1996 a 1997 foram a *S. Typhimurium* (29%) e a *S. Enteritidis* (16%). Tavechio *et al.*, (1996), no Brasil, identificaram 81 sorotipos de 5.490 cepas isoladas de infecções humanas e amostras não-humanas no Estado de São Paulo de 1991 a

1995. Evidenciaram um grande crescimento da incidência de *Salmonella* Enteritidis (1,2% em 91, 10,1% em 1993, 43,3% em 1994 e 64,9% em 1995 em todos os isolados). Kottwitz *et al.* (2010), realizaram uma avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná. Na categoria de carnes e derivados, encontraram um total de 39 (20,8%) pratos prontos à base de carnes suínas, bovinas e de aves e 26 (14,0%) diferentes embutidos frescos e defumados implicados nos surtos de DTA. Os resultados da sorotipagem das 310 cepas de *Salmonella* sp. analisadas, associadas a 254 surtos mostram a prevalência do sorotipo Enteritidis (83,3%).

Em 2004, McEvoy *et al.*, realizaram um estudo a fim de determinar a prevalência de *Salmonella* spp. em fezes de bovinos, rúmen e amostras de carcaça em um abatedouro comercial na Irlanda. Encontraram amostras positivas com maior frequência de ocorrência durante o período de agosto a outubro. A maioria dos isolados do estudo não foram comumente associados à infecção clínica humana, com exceção de *S. Typhimurium* DT104 (R-type ACSSuT).

Pode haver correlação entre a de contaminação por *Salmonella* em carcaças e pele de animais de abate e a contaminação por *E.coli* O157:H7. Brichta-Harhay *et al.* (2008), examinaram a contaminação por *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 da superfície de carcaças e pele de bovinos de abate de 4 regiões geograficamente distintas dos EUA de julho de 2005 a abril de 2006 e encontraram 33,3% dos couros e 4,1% das carcaças contaminados pelos dois patógenos.

Shinohara *et al.* (2008) relatam um estudo sobre a prevalência de *Salmonella* em 122 amostras de carne moída crua adquiridas em 33 açougues na cidade de Gaborone, em Botsuana, país localizado no sul da África, com coletas realizadas entre Agosto de 2002 e Abril de 2003. Esse estudo foi motivado pelo fato da *Salmonella* ter sido isolada da carne bovina e associado a casos de diarreias em crianças daquele país. Das amostras analisadas, 20% apresentaram positividade para *Salmonella* sp. No Brasil, foram pesquisadas quinze amostras de carne bovina moída *in natura*, comercializadas em supermercados da região oeste de São Paulo. Detectou-se a presença de *Salmonella* sp. em uma amostra (SHINOHARA *et al.*, 2008).

A contaminação de produtos utilizados na alimentação animal pode contribuir para manutenção do patógeno na cadeia alimentar. Um estudo realizado por Cardoso *et al.* (2008), com insumos da fabricação de rações para alimentação

animais provenientes dos estados de Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, num total de 513 amostras analisadas, constatou a presença de *Salmonella* sp. em 60 (11,7%) delas. Destas, 45 (75%) foram enviadas para confirmação por sorotipagem em centro de referência. Quanto ao material analisado, a maior ocorrência de *Salmonella* sp. foi observada em farinha de carne (31,66%) e farelo de soja (31,66%). Resíduo de soja, cascas para adição, farelo peletizado de soja, farinha de vísceras, milho, cascas e vagem de soja representaram os 36,68% restantes das amostras positivas.

A avaliação bacteriológica da carne bovina desossada em estabelecimentos comerciais em Cuiabá conduzida por Sigarini (2004), revelou a presença de *Salmonella* sp., antes da desossa, nos dois estabelecimentos amostrados (17,5% em um e 15% no outro).

SILVA *et al.* (2002), avaliou a qualidade de lingüiças mistas tipo frescal produzidas na cidade de Pelotas-RS, e encontrou um percentual de amostras positivas para a presença de *Salmonella* sp. de 17,86% das 32 amostras analisadas.

A pesquisa realizada por Martins *et al.*, (2008), com avaliação de salsichas tipo "hot dog" comercializadas em embalagens à vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói-RJ, revelou a presença de *Salmonella* sp. em três das 50 amostras analisadas, caracterizando-as como impróprias para consumo.

Em Campina Grande, Estado da Paraíba, foram analisadas vinte amostras de carne de sol comercializada em estabelecimentos e feiras livres. Dez amostras foram colhidas à temperatura ambiente e dez sob refrigeração. A presença de *Salmonella* sp. foi constatada em 40% das amostras comercializadas em temperatura ambiente e em 30% das amostras sob refrigeração (SHINOHARA *et al.*, 2008).

Surtos relacionados à *Salmonella* sp. estão mais relacionados ao consumo de carne de aves, ovos e carnes suínas, o que se deve provavelmente à falta de notificação e investigação epidemiológica adequada de episódios de infecções alimentares no Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS

Para a realização do presente trabalho foram colhidas amostras em um estabelecimento de abate de bovinos na região oeste do Paraná, com Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) dotado de condições técnicas e higiênico-sanitárias e habilitado à exportação.

Os animais amostrados eram advindos de lotes mistos de animais mestiços de corte, de regiões próximas ao estabelecimento de abate, na região Oeste do Paraná.

3.1.1 INSTALAÇÕES E PROCESSO DE ABATE

Na indústria, em etapa anterior ao abate, os bovinos recebem banho de aspersão com água à temperatura ambiente, hiperclorada, com pressão de três atm, durante três minutos, para limpeza dos animais e para que haja vasoconstrição periférica, de forma a facilitar a sangria. Em seguida os animais são conduzidos ao *box* de atordoamento por uma seringa, que é o afunilamento da rampa onde os animais passam em fila indiana até o mesmo. A seringa possui chuveiros em toda sua extensão com água hiperclorada à pressão de três atm. A insensibilização em seguida à seringa é realizada através de percussão cerebral por meio de uma pistola pneumática com dardo cativo e é realizada com o bovino dentro de um *box* metálico de fundo falso. Após insensibilização o bovino cai na área de vômito onde é feita uma lavagem do perianal e em seguida o animal é içado pela pata esquerda através de sistema de corrente mais carretilha. Em seguida é suspenso através de um guincho para o trilho alto, pelo qual é conduzido à sangria na sala de abate (não climatizada no estabelecimento).

A sangria ocorre logo após a insensibilização do animal e é realizada na área de sangria ou canaleta de sangria, seguida imediatamente por estimulação elétrica das carcaças. A sangria é realizada com faca apropriada, mediante abertura sagital da barbela. Em seguida, o operador troca a faca para realizar a divulsão e secção dos grandes vasos do pescoço. Pela abertura inicial, a faca é introduzida em direção ao peito do animal, onde são seccionadas a artéria aorta e veia cava anteriores ou, outras vezes, junção das artérias carótidas.

Faz-se a retirada dos mocotós (articulações carpometacarpianas e tarso-metatarsianas) e serragem ou cortes dos chifres. Logo depois tem início a esfolação aérea, com o animal pendurado na trilhagem aérea e sua progressão automatizada (nora mecanizada), com abertura da barbela até a região do mento, incisão longitudinal da pele do peito até o ânus e corte das patas traseiras. Enquanto se segue a esfolação dos membros posteriores na plataforma alta, é realizada a esfolação da cabeça, para facilitar a posterior retirada da pele, seguida da esfolação dos membros dianteiros. Logo em seguida é feita a oclusão do reto que consiste em separá-lo de seus ligamentos, envoltura em saco plástico, amarração e recolocação novamente para dentro da cavidade. Procede-se em seguida a retirada total do couro no rolo e em seguida é feita a oclusão da porção anterior do esôfago que consiste em separá-lo de suas ligações com a traquéia por meio de saca-rolha e em seguida oclusão com lacre plástico.

A cabeça é em seguida desarticulada e numerada no côndilo do occipital com o mesmo número que foi posto na face articular do carpo ou no atlas e lavada externa e internamente em lavador próprio para depois ser colocada na nória de inspeção.

Tem início a evisceração, com abertura das cavidades pélvica e abdominal, retirada em uma única etapa do tubo gastrintestinal (intestino, estômago, pâncreas, baço e bexiga). Em seguida retira-se o fígado e posteriormente os pulmões e o coração. Todos estes órgãos são colocados sobre a mesa rolante de inspeção de vísceras. Todas as vísceras retiradas são depositadas em compartimentos apropriados nas mesas móveis, para posterior inspeção.

Quando os achados “post-mortem”, encontrados nas linhas de inspeção, necessitam de inspeção detalhada e adoção de critério de julgamento diferenciado, os órgãos e carcaças acometidos são encaminhados ao departamento de inspeção final - DIF.

Após a evisceração as carcaças são divididas através de serra elétrica em duas meias carcaças e submetidas à toailete para remoção dos rins, rabo, gorduras e medula. Seguem depois para lavagem final através de jatos de água à temperatura de 38-40°C e sob pressão mínima de três atmosferas com o objetivo de eliminar esquirolas ósseas decorrentes do processo de serragem, restos de medula espinhal e excessos de gordura (superficial, externa e interna), coágulos e pêlos. Após o toailete as carcaças são carimbadas e encaminhadas para as câmaras de resfriamento até atingirem a temperatura de 0° a mais ou menos 1° centígrado.

3.2 COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS

Entre o período de abril e julho de 2010 foi realizada colheita periódica (uma a cada duas ou três semanas, totalizando cinco visitas à indústria) e aleatória de amostras superficiais de 25 carcaças bovinas em diferentes etapas do abate e 50 amostras de fezes no matadouro-frigorífico selecionado.

Na sala de matança da indústria, a cada visita, amostras superficiais de cinco carcaças foram colhidas nas seguintes etapas do abate: A) na calha de sangria, B) após esfola, C) após evisceração e D) após lavagem final das meias-carcaças. Em cada etapa do abate (A, B, C e D) selecionada, cinco carcaças foram amostradas em quatro pontos distintos e aleatórios, com auxílio de esponjas abrasivas (3M Dry Sponge, código HB004010656) hidratadas com 10 mL de solução salina peptonada – SSP 0,2% (NaCl Dinâmica e peptona Inclab) e moldes de 100cm² (10cm x 10cm) estéreis (papel craft), conforme ilustrado na figura 1 e de acordo com recomendações vigentes na Comunidade Européia (EC, 2007), totalizando 400cm², divididos em duas sub-amostras de 200cm². Cada sub-amostra foi obtida pela fricção de uma esponja. Assim, para cada 400cm² obtidos, foram utilizadas 2 esponjas. As mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração até a realização das análises laboratoriais. A figura 1 a seguir exemplifica os pontos (*) de coleta de amostras nas carcaças:

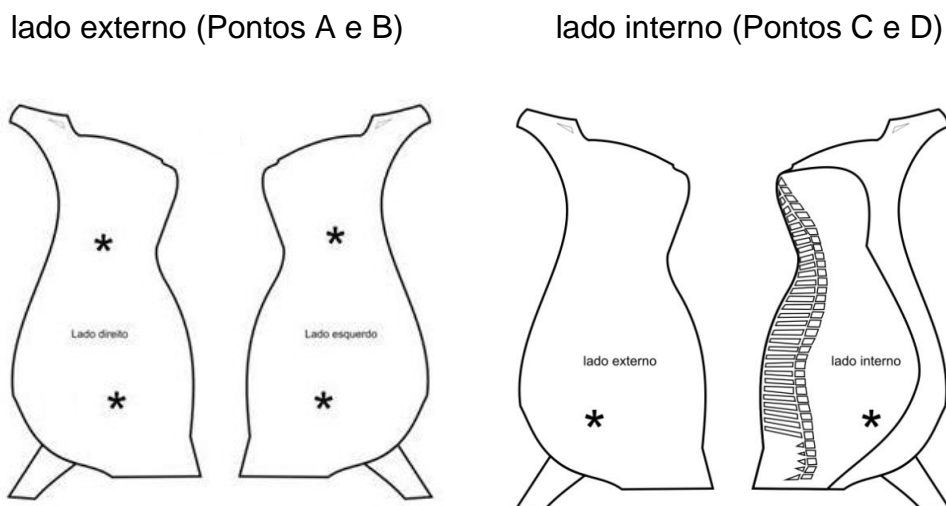


FIGURA 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE BOVINOS (PONTOS A e B) E CARCAÇAS BOVINAS (PONTOS C e D, LADO EXTERNO E LADO INTERNO), COM INDICAÇÃO DOS PONTOS (*) ONDE FOI FEITA A COLETA DE AMOSTRAS SUPERFICIAIS EM ÁREAS DELIMITADAS DE 100 cm² (10cm X 10cm).

De acordo com a etapa de abate, e conforme ilustração na Figura 1, as coletas seguiram o seguinte critério:

- Etapa de abate A (calha de sangria - pele): no animal inteiro foram obtidos dois pontos de 100 cm² na superfície externa esquerda e dois pontos de 100 cm² na superfície externa direita – 200cm² em cada lado, totalizando 400cm² em cada carcaça, e assim por diante nos pontos seguintes.

- Etapa de abate B (após a esfolação): na carcaça inteira foram obtidos dois pontos de 100 cm² na superfície externa esquerda e dois pontos de 100 cm² na superfície externa direita.

- Etapa de abate C (após serragem das meias-carcaças e evisceração): nas meias-carcaças foram obtidos dois pontos de 100 cm², um na superfície externa esquerda e outro na superfície interna esquerda e dois pontos de 100 cm², um na superfície externa direita e outro na superfície interna direita.

- Etapa de abate D (após lavagem final): nas meias-carcaças foram obtidos dois pontos de 100 cm², um na superfície externa esquerda e outro na superfície interna esquerda e dois pontos de 100 cm², um na superfície externa direita e outro na superfície interna direita.

As coletas de amostras foram realizadas com as mesmas carcaças ao longo de todos os pontos (A, B, C e D) durante todo o processo de abate.

Em condições estéreis, cada conjunto de duas esponjas correspondente a cada um dos quatro pontos no abate (A, B, C e D) foi adicionado de 180mL de SSP 0,2% e submetido à homogeneização por cinco minutos em homogeneizador peristáltico tipo “*Stomacher*” para que pudesse ser submetido às análises microbiológicas propostas. Ao final desse processo, o homogeneizado resultante representou um equivalente de $1\text{mL} = 2\text{ cm}^2$.

Todos os homogeneizados obtidos foram submetidos a diluições seriadas em escala decimal, utilizando-se água peptonada 0,2% (Oxoid), para realização de análises microbiológicas dos micro-organismos indicadores, cujos resultados foram expressos em UFC/cm². Para a pesquisa dos patógenos foram realizadas análises de presença ou ausência de cada patógeno, referente aos 400 cm² colhidos. Dessa forma, os resultados da presença ou ausência obtidos em 400 cm² foram expressos por Presença ou Ausência/carcaça.

Amostras de fezes também foram colhidas, em média 30g de cada trato gastrointestinal, das mesmas cinco carcaças referentes aos *swabs* superficiais e outras cinco carcaças adjacentes, totalizando 10 amostras fecais em cada visita. As fezes foram colhidas diretamente da região próxima ao ceco a partir das vísceras nas mesas de inspeção de vísceras e miúdos com o auxílio de facas esterilizadas em água quente (85°C) e sacos plásticos estéreis, sendo imediatamente acondicionadas sob refrigeração.

No laboratório foram pesadas três frações de 10g de fezes de cada amostra em sacos estéreis tipo “*stomacher*” para cada um dos patógenos investigados: *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* sp., completando-se o volume com 90mL do caldo de enriquecimento referente ao micro-organismo pesquisado conforme descrição no item 3.3.

3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.3.1 Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene

Todas as amostras dos *swabs* superficiais de carcaças obtidas foram submetidas à enumeração de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes a 35°C e *E. coli*, e utilizando-se placas de Petrifilm™ AC, Petrifilm™ CT, Petrifilm™ EB e Petrifilm™ EC, respectivamente. Todas as placas foram incubadas a 35°C por 24-48h, conforme recomendação do fabricante e decorrido o período de incubação as colônias formadas foram enumeradas. Os resultados finais foram expressos em UFC/cm².

3.3.2 Isolamento de *Listeria monocytogenes*

Todas as amostras de carcaças e fezes colhidas foram submetidas ao isolamento de *L. monocytogenes* conforme a metodologia preconizada pelo *International Organization for Standardization*, ISO 11.290-1 – *Detection method* (ISO, 1996) e ISO 11.290-2 – *Enumeration method* (ISO, 1998).

Para as fezes foram pesadas 10g das amostras em sacos estéreis de “*stomacher*”, adicionados 90mL de Half Fraser suplementado com novobiocina (Oxoid), homogeneizados em homogeneizador peristáltico e o homogeneizado foi incubado a 30°C/18-24 horas.

Para as amostras superficiais, depois de completados os volumes para 200mL dos conjuntos de esponjas de carcaças de cada um dos quatro pontos de abate (A, B, C e D), as mesmas foram homogeneizadas e tiveram alíquotas de 40mL transferidas para tubos cônicos que foram submetidos à centrifugação em centrífuga SIGMA a 1000 x g por 15 minutos). Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante com pipeta graduada estéril. Foi realizada uma nova suspensão do sedimento em 10mL de caldo Half Fraser suplementado (Oxoid - Suplemento SR166E) e incubação da suspensão por 18-24 horas a 30°C.

A partir deste ponto, o protocolo analítico utilizado foi idêntico para as amostras superficiais e de fezes.

A seguir foi realizado o enriquecimento seletivo secundário, transferindo-se 0,1 mL do caldo Half Fraser (inclusive das amostras de fezes) para tubos contendo 10mL de caldo Fraser (Oxoid), com incubação a 35°C por 48 horas. Após decorrido o período de incubação foram plaqueados por esgotamento 0,1mL da solução de enriquecimento seletivo secundário no ágar Oxford (Oxoid) e 0,1mL no ágar Aloa (Oxoid). Ambos os meios foram incubados por 30° C de 18 a 24h. No ágar Oxford modificado as colônias de *Listeria* spp. apresentam coloração negra com presença de halo também negro, referente à hidrólise da esculina. Depois do período de incubação, três a cinco colônias suspeitas de *Listeria* spp., de ambos os meios de cultura, foram transferidas para placas de ágar soja tripticase com 0,6% de extrato de levedura (TSA–YE 0,6%) (TSA - Oxoid, YE – Difco) para purificação das colônias, com incubação a 37°C por 24horas. Em seguida foi verificada a característica típica de *Listeria* spp. sob luz transmitida a 45° (método de Henry) – colônias com aspecto de vidro moído e coloração azulada seriam submetidas à identificação bioquímica, mas não foram observadas.

Após confirmação da espécie (*L. monocytogenes*), os isolados seriam remetidos à identificação sorológica com antissoros somáticos e flagelares, conforme descrito por Seelinger & Hohne (1979) e Garcia *et al.* (1990).

Para identificação uma colônia característica de cada placa de TSA-YE seria selecionada e estocada em tubos contendo TSA-YE e submetidas à identificação bioquímica e molecular. A partir dos tubos, seriam realizados os testes bioquímicos de reação de catalase, fermentação de carboidratos, e teste de verificação de hemólise e outros testes complementares como coloração de Gram e teste de motilidade, conforme Pagotto *et al.* (2006). Testes cujos resultados fossem duvidosos seriam confirmados pelo API Listeria (*kit* - Biomérieux). Todas as provas seriam realizadas na presença de um controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644), para descartar qualquer falha dos reagentes ou preparo dos meios de cultura. Considerando os resultados obtidos nos testes bioquímicos, as culturas obtidas seriam identificadas conforme combinação descrita na Tabela 2.

TABELA 2: Características bioquímicas fermentativas / hemolíticas das principais espécies do gênero *Listeria*.

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

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

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

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

FONTE: ADAPTADO DE SEELINGER & HOHNE (1979).

3.3.3 Detecção de *Escherichia coli* O157:H7

Todas as amostras coletadas foram submetidas à metodologia de detecção descrita pela *Food Safety Inspection Service* (DEY & LATTUADA, 1998). A metodologia proposta emprega meios de enriquecimento e isolamento adicionados de diversas substâncias antimicrobianas, que tem a função de inibir o desenvolvimento da microbiota acompanhante e possíveis interferências. Os meios MacConkey Sorbitol (SMAC - Oxoid), MacConkey Sorbitol Telurito-Cefixime (TC-SMAC – Oxoid)) e Caldo de Enriquecimento para *Escherichia* (TSB – Trypticase Soy Broth com Novobiocina - Oxoid) foram preparados de acordo com as recomendações do FDA (2008).

Para as fezes foram pesadas 10g das amostras em sacos estéreis de “*stomache*”, adicionados 90mL de TSB suplementado com novobiocina, homogeneizados em homogeneizador peristáltico e o homogeneizado foi incubado a 42°C/18-24 horas.

Para as amostras superficiais, depois de completados os volumes para 200mL dos conjuntos de esponjas de carcaças de cada um dos quatro pontos de abate (A, B, C e D) as mesmas foram homogeneizadas e tiveram alíquotas de 40mL transferidas para tubos cônicos que foram submetidos à centrifugação em centrífuga SIGMA a 1000 x g por 15 minutos). Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante com pipeta graduada estéril. Foi realizada uma nova suspensão do

sedimento em 10mL de TSB suplementado com Novobiocina e incubação a 42°C por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação a suspensão e o homogeneizado de fezes foram submetidos à metodologia por separação imunomagnética (IMS – *kit* Invitrogen): 1mL do caldo de enriquecimento foi transferido para tubos “*ependorffs*”, adicionado de 20µL das “*Dynabeads*” (microesferas metálicas) e submetido à rotação em carrossel por 10 minutos para a máxima aglutinação entre antígeno e anticorpo. Em seguida, os *ependorffs* foram colocados em estante magnética por 3 minutos onde o sobrenadante foi retirado com micropipeta seguindo-se lavagens repetidas (três ou quatro vezes) do sedimento com PBS-TWEEN (Phosphate Buffered Saline – Tween). Foram adicionados 100 µL de PBS-TWEEN pela última vez e promovida agitação para ressuspensão das esferas metálicas. Uma alçada desta solução foi plaqueada por esgotamento em ágar MacConkey Sorbitol (SMAC) e outra em MacConkey Sorbitol Telurito-Cefexime (TC-SMAC) e incubadas a 41,5°C por 18 à 24h. Foram selecionadas três a cinco colônias típicas dessas placas (colônias transparentes como “gotas de orvalho” – sorbitol negativas), acondicionadas em tubos contendo TSA (Oxoid) – YE (Difco) 0,6% e posteriormente enviadas à Universidade Federal de Viçosa (UFV) para identificação bioquímica e molecular das cepas.

3.3.4 Detecção de *Salmonella* sp.

Todas as amostras de carcaças e fezes coletadas foram submetidas ao isolamento de *Salmonella* sp. conforme a metodologia ISO 6579 – *Detection method*, preconizada pelo *International Organization for Standardization* (ISO, 2002).

Para as amostras superficiais, após completados os volumes para 200mL dos conjuntos de esponjas de carcaças de cada um dos quatro pontos de abate (A, B, C e D), as mesmas foram homogeneizadas e tiveram alíquotas de 40mL transferidas para tubos cônicos que foram submetidos à centrifugação em centrífuga SIGMA à 1000 x g por 15 minutos). Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante com pipeta graduada estéril. Foi realizada uma nova suspensão do sedimento em 10mL de APT (Oxoid) e incubação a 35°C por 18 a 24 horas.

Para as fezes foram pesadas 10g das amostras em sacos estéreis tipo “stomacher”, adicionados 90mL de APT, homogeneizados em homogeneizador peristáltico e o homogeneizado foi incubado a 37°C/18-24 horas.

Em seguida foi realizado o enriquecimento seletivo secundário, transferindo-se alíquotas de 1mL do meio do pré-enriquecimento (inclusive das amostras de fezes) para tubos contendo: em um 10mL de caldo tetrionato Muller-Kauffman (Oxoid) e em outro 0,1mL em caldo Rappaport Vassiliadis Soya (Oxoid). Os dois caldos foram incubados à 37°C/18-24 horas.

As colônias típicas de *Salmonella* podem ser identificadas pelas características morfológicas e bioquímicas particulares, apresentadas decorrido o período de incubação (colônias negras puntiformes sem halo mucóide). Para o plaqueamento seletivo diferencial e identificação das colônias típicas, foram utilizados os ágaros xilose lisina desoxicolato (XLD - Oxoid)) e manitol-lisina-cristal violeta-bile (MLCB - Oxoid)). De cada meio de enriquecimento seletivo foram transferidas alçadas pela técnica de esgotamento superficial ágaros XLD e MLCB, utilizando-se de uma alça de níquel. As placas foram incubadas a 35-37°C/18-24 horas.

A identificação das colônias típicas de *Salmonella* foi realizada pelas características morfológicas e bioquímicas particulares, apresentadas decorrido o período de incubação (colônias negras puntiformes sem halo mucóide).

Para fins de identificação bioquímica, colônias típicas foram repicadas com ajuda de agulha de níquel em tubos contendo os ágaros Triple Sugar Iron Agar (TSI - Oxoid) e Lysine Iron Agar (LIA - Oxoid) que foram incubados a 37°C/24 horas. Decorrido o período de incubação, os tubos característicos (LIA – base alcalina, superfície alcalina, H₂S positivo; TSI – base ácida, superfície alcalina, H₂S positivo). Em uma etapa seguinte, as amostras seriam submetidas à sorologia (amostras positivas não foram detectadas).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma via e teste de comparação de médias (Tuckey),

utilizando nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando o programa MSTAT-C, desenvolvido pela Michigan State University (MSTATC, 1991).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total das 25 amostras analisadas, todas apresentaram resultados negativos para os micro-organismos patogênicos *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. Com relação à *E.coli*, 75 colônias típicas (sorbitol negativas após cultivo em ágar SMAC e TCSMAC) foram isoladas em 33 das 50 amostras analisadas (18 amostras superficiais de carcaças e 15 amostras de fezes), mas após identificação bioquímica, as cepas foram negativas para *E. coli* O157: H7, corroborando com os resultados obtidos por Chesca *et al.* (2010). Os autores realizaram um estudo envolvendo análises de 120 carcaças de bovinos abatidos para exportação e 100% das amostras foram negativas para *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, sendo apenas uma amostra positiva para *Salmonella* sp. (0,84%). Resultados semelhantes foram obtidos por Braga (2008), que realizou pesquisa de *Salmonella* em carcaças bovinas em um matadouro-frigorífico localizado no município de Uberlândia, no Triângulo Mineiro. Todos os resultados obtidos da análise de 40 carcaças foram negativos. Os resultados negativos para *Listeria* provavelmente se devam à temperatura (ambiente) de coleta, que favoreceu o desenvolvimento de outros micro-organismos. Os outros resultados ficaram abaixo dos níveis de detecção da metodologia utilizada. Fontoura *et al.* (2006) avaliaram, em um matadouro frigorífico localizado no interior do Estado de São Paulo, sob inspeção federal, a superfície externa de 80 carcaças bovinas (coxão, lombo e ponta de agulha) sendo 40 logo após a lavagem e 40 após 24 horas sob refrigeração. Bactérias do gênero *Salmonella* e *Listeria* não foram encontradas em nenhuma das amostras.

Jardim *et al.* (2006) avaliaram a contaminação microbiana do couro e da superfície de carcaças bovinas, provenientes de animais em diferentes sistemas de engorda (extensiva em pastagem e intensiva em confinamento). As contagens médias (Log UFC/cm²) de aeróbios mesófilos e anaeróbios facultativos, coliformes a 35°C e *E. coli* evidenciaram números superiores nas amostras provenientes de bovinos em pastagem, e no caso da pele essas diferenças foram estatisticamente

significativas. Essa constatação foi confirmada pela observação de que os animais de confinamento apresentavam o couro mais limpo, visualmente, no momento do abate.

Os resultados obtidos na quantificação superficial dos micro-organismos indicadores (log de UFC/cm²) estão distribuídos entre as Figuras 2 e 5.

Os resultados das análises em Petrifilm® AC para mesófilos aeróbios para as amostragens de 1 a 25 podem ser visualizados na figura 2:

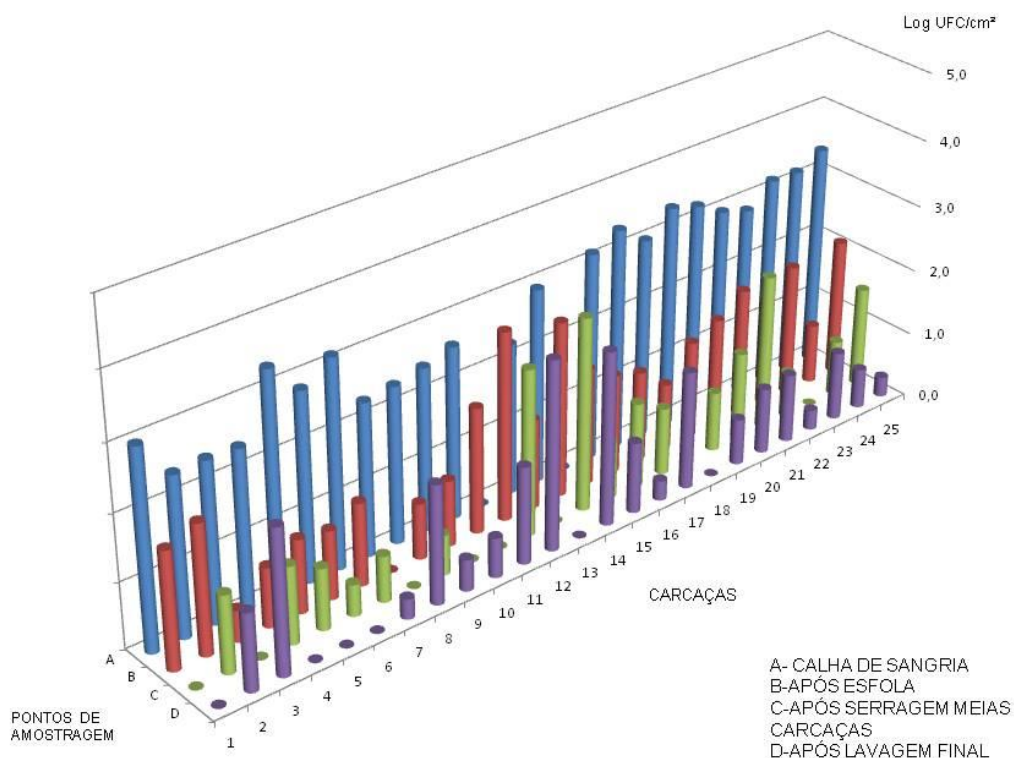


FIGURA 2. CONTAGEM DE MESÓFILOS AERÓBIOS (AC) AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA (A, B, C e D) DURANTE A LINHA DE ABATE DE BOVINOS (LOG UFC/cm²).
FONTE: O AUTOR.

Conforme pode ser observado na Figura 2, e avaliando-se os resultados individualmente em cada uma das 25 carcaças amostradas, observa-se que houve redução da contaminação superficial por mesófilos principalmente ao se comparar as contagens obtidas entre os pontos de coleta A e D, em maior parte devido à técnica higiênica do abate e lavagem final das carcaças com água hiperclorada sob pressão.. Contudo, entre os pontos C e D, após a serragem em meias carcaças /

evisceração e após a lavagem final, respectivamente, houve manutenção ou até mesmo aumento da contaminação entre estes pontos (Figura 2: carcaças 2, 3, 7-12, 14-17 e 19-25), o que sugere uma contaminação cruzada de carcaças. Essa contaminação cruzada pode advir de contato com manipuladores e/ou equipamentos contaminados. A carcaça número 12 foi a que apresentou maior contaminação no último ponto amostrado (ponto D, após lavagem final da carcaça), de 2,9 Log UFC/cm². De qualquer forma, este resultado ainda é inferior à maioria de outras pesquisas como as de Hansson (2001), França Filho *et al.* (2006), Nouichi & Hamdi (2009).

As contagens obtidas nas análises de mesófilos aeróbios (entre 2,3 e 3,4 Log UFC/cm² e média de 1,46 Log UFC/cm²) foram inferiores àquelas obtidas por França Filho *et al.* (2006) que ficaram entre 4,7 e 4,5 Log UFC/cm². Também foram inferiores aos valores encontrados por Hansson (2001) de até 4,92 Log UFC/cm² em abatedouros de alta capacidade (como o estudado nesta pesquisa) e até 6,88 Log UFC/cm² em abatedouros de baixa capacidade (abate de no máximo 20 animais/semana). As contagens de mesófilos aeróbios situaram-se, ainda, em níveis melhores aos consideráveis aceitáveis pela decisão 471/2001 da União Europeia (EC, 2001), que considera aceitáveis níveis até 3,5 Log UFC/cm².

As contagens obtidas no presente estudo se assemelharam às de Arenas *et al.* (2004) entre 1,69 e 3,8 Log UFC/cm² em pesquisa realizada em um pequeno abatedouro na Venezuela, sendo que as maiores contagens obtidas foram colhidas próximas à região anal das carcaças, o que pode acarretar em respingos de material fecal durante o abate. Nouichi & Hamdi (2009), em um abatedouro na Algeria, encontraram contagens médias de mesófilos aeróbios em de 4,48 Log UFC/cm² em carcaças bovinas. Os valores encontrados por Jardim, Silva & Ramos (2004), no Triângulo Mineiro, de 3,72 Log UFC/cm², também foram semelhantes aos encontrados no presente estudo (em média 2,66 Log UFC/cm²) logo após a sangria e maiores após a lavagem das meias-carcaças (2,09 Log UFC/cm² dos referidos autores contra a média de 0,87 Log UFC/cm² encontradas nesta pesquisa).

Segundo Gill (1998), de uma maneira geral níveis de contaminação por aeróbios mesófilos abaixo de 10⁵ UFC/cm² de carcaças bovinas indicam boas condições de higiene durante o abate. Contudo, em níveis acima de 10⁶ UFC/cm² indicam início de processo de deterioração, com produção de odores típicos e redução do “*shelflife*” (tempo de prateleira). Considerando esse parâmetro, pode-se

afirmar que os resultados encontrados na presente pesquisa, cuja média final foi de 1,46 Log UFC/cm² para AC, 0,3 Log UFC/cm² para EB, 0,23 Log UFC/cm² para CT e 0,21 Log UFC/cm² para EC, conforme pode ser observado na Tabela 3, estão de acordo com os padrões de qualidade e inocuidade descritos.

Os resultados das análises de enterobactérias (EB) mostraram mais claramente a eficiência higiênica do processo. Apenas a quarta carcaça amostrada apresentou contagem diferente de zero (significando níveis não detectáveis por este método de análise), no ponto “C” (após evisceração), que foi de 1 Log UFC/cm² (10 UFC/cm²), conforme apresentado na figura 3, a seguir:

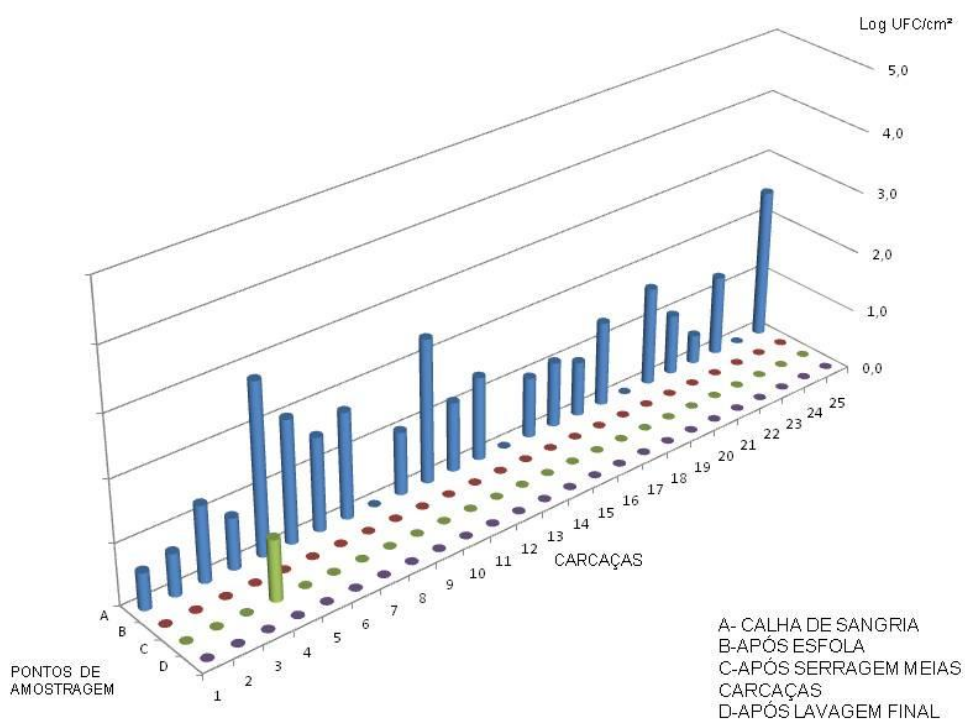


FIGURA 3. CONTAGEM DE ENTEROBACTÉRIAS (EB) AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA (A, B, C e D) DURANTE A LINHA DE ABATE DE BOVINOS (LOG UFC/cm²).
FONTE: O AUTOR.

Em média, foi obtida uma contagem de 1,15 Log UFC/cm² de enterobactérias no ponto A, logo após a sangria. Com exceção do ponto C (após evisceração), em que a contagem média foi de 0,04 Log UFC/cm², em nenhum outro ponto foram obtidas contagens, demonstrando estas serem abaixo do nível de detecção do

método. As contagens para enterobactérias ficaram dentro dos padrões estabelecidos pela Decisão 471/2001 da União Europeia (EC, 2001), que considera aceitáveis níveis de até 1,5 Log UFC/cm² em amostras superficiais de carcaças bovinas. McEvoy *et al.* (2004), em uma pesquisa realizada em um abatedouro Irlandês, encontraram números mais elevados, em torno de 2,75 Log UFC/cm² de contagem de enterobactérias antes da evisceração e 3,03 Log UFC/cm² após a lavagem das carcaças.

A contagem média de coliformes a 35°C (CT) está indicada na Tabela 3. Por esta tabela, e pela figura 4, observa-se que para este grupo de micro-organismos, foram obtidas contagens baixas. As coletas no ponto A (animais com pele, na calha de sangria) apresentaram de 0 à 2,6 Log UFC/cm² (em média 0,99 Log UFC/cm²) sendo reduzidas à zero (não detectável) já no segundo ponto, onde a esfolagem já tinha sido iniciada (Ponto B). Apenas uma das carcaças amostrada apresentou contaminação por CT no segundo ponto de amostragem (1 Log UFC/cm²), na primeira coleta de amostras (carcaça 5).

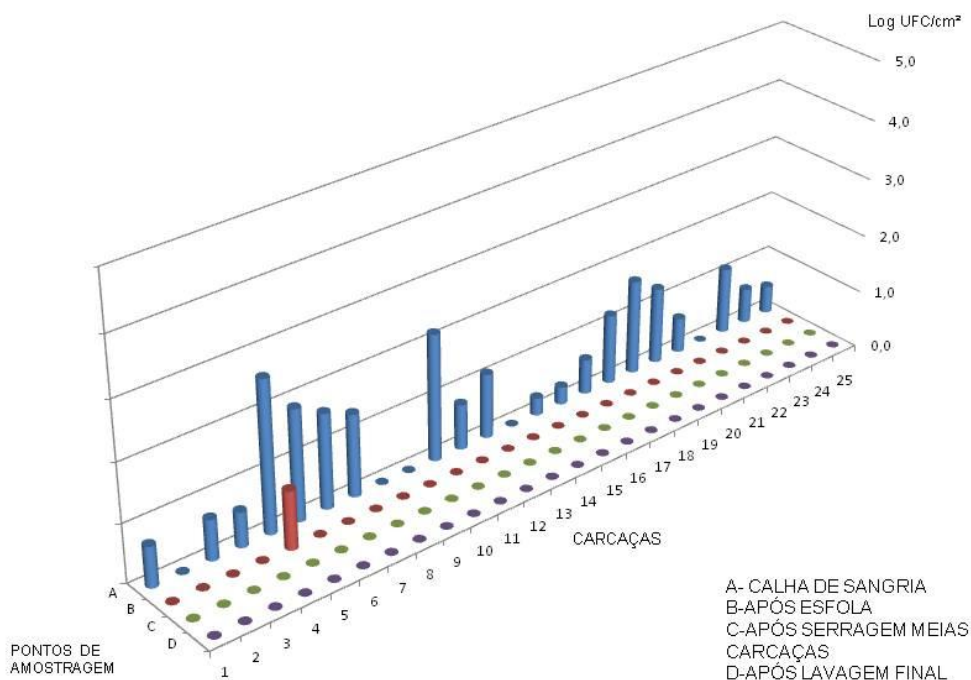


FIGURA 4. CONTAGEM DE COLIFORMES A 35°C (CT) AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA (A, B, C e D) DURANTE A LINHA DE ABATE DE BOVINOS (LOG UFC/cm²).
FONTE:O AUTOR.

Na carcaça 5 (Figura 4) foi encontrada contagem de CT (2,26 Log UFC/cm² no ponto A e 1 Log UFC/cm² no ponto B) e contagem de 0,7 Log UFC/cm² de *Escherichia coli* no ponto C (Figura 5). Nessa mesma carcaça houve uma contagem de EB inferior ao CT. Essas contagens foram atípicas e inesperadas uma vez que *E. coli* pertence ao grupo dos coliformes a 35°C que por sua vez pertencem ao grupo das enterobactérias (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Estes podem estar relacionados com questões relativas às técnicas analíticas.

As contagens de coliformes a 35°C (CT) e *E. coli* (EC) obtidas por Alonso *et al.* (2007) antes da esfola ficaram entre 0 e 2,2 Log UFC/cm², em bovinos de confinamento. No ponto D (após lavagem das meias-carcaças), porém, a contaminação não pôde mais ser evidenciada, demonstrando a importância da lavagem final das carcaças antes da frigorificação.

A contagem máxima obtida, de 2,2 Log UFC/cm² é bem superior aos 0,65 Log UFC/cm² obtidos por Jardim *et al.* (2006) que obteve contagem de CT de 1,27 para animais a pasto e 0,64 Log UFC/cm² nos animais em confinamento. Estes autores, entretanto, observaram uma manutenção da contaminação após a esfola e após a lavagem das carcaças, de 0,4 Log UFC/cm² de CT e EC, tanto para os animais de confinamento quanto para aqueles a pasto.

Neste estudo, com exceção das contagens de mesófilos, após a esfolagem somente as carcaças 4 e 5 apresentaram algum nível de contaminação (Figuras 3, 4 e 5), sendo que foram reduzidas a zero após a lavagem das carcaças.

Elder *et al.* (2000) relatam pesquisa realizada em abatedouros do centro-oeste americano, onde foram coletadas amostras de várias etapas do processamento de carcaças bovinas. Os resultados também demonstram a redução dos percentuais de contaminação iniciais após o processamento, inferindo a efetividade dos procedimentos sanitários adotados, semelhantes ao da indústria amostrada nesta pesquisa.

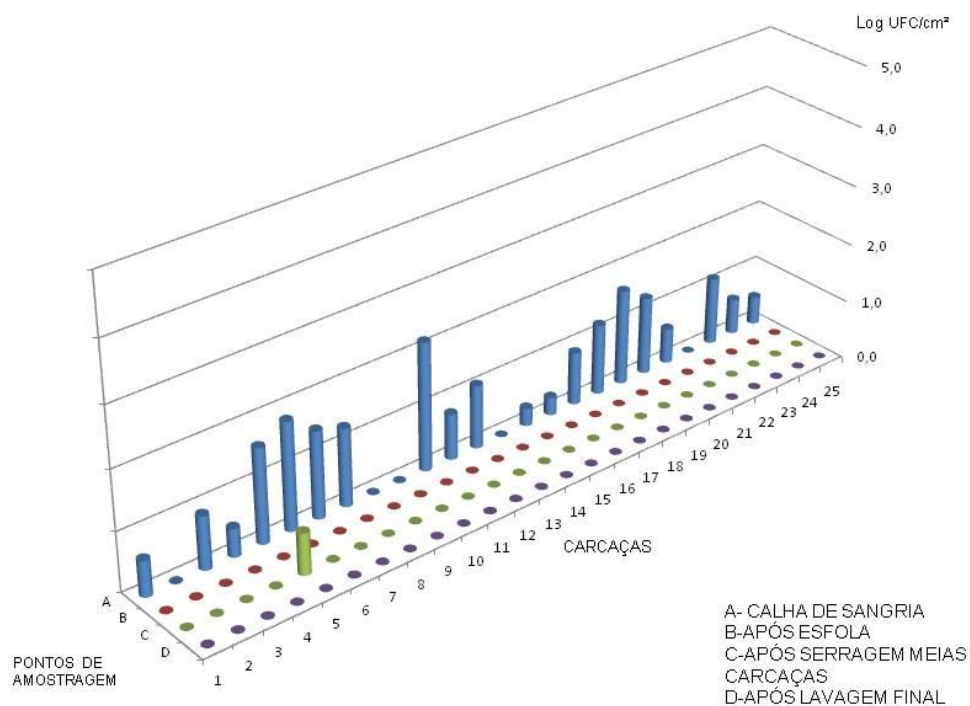


FIGURA 5. CONTAGEM DE *E. coli* (EC) AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA (A, B, C e D) DURANTE A LINHA DE ABATE DE BOVINOS (LOG UFC/cm²).
FONTE: O AUTOR.

Os demais pontos de amostragem, subsequentes à retirada da pele (ponto A), não apresentaram contaminação pelos indicadores pesquisados. As contagens de *E. coli* no ponto “A”, segundo a Figura 5, variaram entre 0 e 2,2 Log UFC/cm², sendo reduzidas a zero no último ponto amostrado, após a lavagem final das carcaças. Schwach (2007) descreveu a avaliação da contaminação por *E. coli* em dois pontos distintos, um antes e um depois da implantação de um ponto crítico de controle – PCC para contaminação gastrointestinal de carcaças bovinas antes da lavagem final das mesmas. O autor encontrou valores em torno de 1,02 Log para o grupo de carcaças analisadas antes da implantação do PCC e 0,26 Log para o grupo posterior à implantação. Os valores encontrados pelo autor, em consonância com os valores encontrados neste estudo, comprovam a eficiência das medidas de controle da contaminação (controle de qualidade do processo, adoção de boas práticas e sistema HACCP), também adotadas na indústria amostrada, para redução da contagem microbiana após a lavagem final das meias carcaças.

Após a realização da análise de variância, o teste de Tukey revelou não existirem diferenças significativas entre os pontos B, C e D para mesófilos, enterobactérias, coliformes a 35°C e *E. coli*, sendo os referidos pontos significativamente menores que o ponto A (após a sangria), conforme pode ser observado na tabela 3:

TABELA 3. Variação média dos micro-organismos indicadores (UFC/cm²) nos pontos amostrados ao longo da linha de abate.

	MICRO-ORGANISMO INDICADOR							
	AC	DP	CT	DP	EB	DP	EC	DP
PONTO								
A	2,99 ^b	2,89	1,53 ^b	1,92	1,82 ^b	2,14	-1,27 ^b	1,51
B	1,92 ^a	2,21	-0,38 ^a	0,30	-0,62 ^a	-0,12	-1,70 ^a	-0,70
C	1,81 ^a	2,26	-1,70 ^a	-1,00	-0,11 ^a	0,44	-1,40 ^a	0,00
D	1,80 ^a	2,22	0,00 ^a	0,00	-1,70 ^a	-1,00	0,00 ^a	0,00
MÉDIA	1,46		0,30		0,23		0,21	

(*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

AC. Mesófilos aeróbios.

PONTO A. Na calha de sangria.

EB. Enterobactérias.

PONTO B. Após esfola.

CT. Coliformes totais.

PONTO C. Após serragem em meias-carcaças/evisceração.

EC. *Escherichia coli*.

PONTO D. Após lavagem final.

DP. Desvio padrão.

FONTE: O AUTOR.

É importante salientar que a União Europeia por meio da Decisão N°471/2001 (EC, 2001), indica como método não destrutivo para a colheita das amostras de superfícies de carcaça, a utilização de esponjas de celulose, que foi o método adotado na presente pesquisa. Os dados de outros trabalhos, utilizados para comparação podem apresentar resultados diferentes em função da aplicação de métodos diversos para colheita de amostras. Os resultados das contagens de micro-organismos indicadores demonstraram a eficiência higiênica do processo produtivo de carne bovina na indústria estudada, concordando com Fontoura (2006), Schwach (2007) e França Filho *et al.* (2006), que também comprovaram a eficiência das boas condições higiênico-sanitárias de abate sobre a população destes micro-organismos em carcaças bovinas. No entanto, dentre os quatro grupos estudados, os mais indicados para avaliar a contaminação durante processo seguem sendo o grupo das

enterobactérias e *E. coli*, uma vez que a pesquisa destes nos alimentos, segundo Franco & Landgraf (2008) nos fornece informações mais seguras sobre as condições higiênicas ou a presença de enteropatógenos.

5 CONCLUSÕES

De acordo com as condições observadas nas carcaças analisadas, o processo tecnológico de abate nesta indústria no período estudado foi satisfatório para a garantia da inocuidade microbiológica das carcaças bovinas.

A enumeração de micro-organismos indicadores ao longo do processo de abate como forma de monitoramento da contaminação é imprescindível para a indústria de processamento tecnológico da carne bovina. Em virtude da maior contaminação encontrada na pele dos animais, a etapa de esfolagem tem fundamental importância para a redução significativa encontrada nas carcaças bovinas, uma vez que a retirada da pele de forma higiênica garante uma drástica redução desta contaminação superficial das carcaças nas etapas seguintes do abate.

A não detecção dos patógenos *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *E. coli* O157:H7 tanto nas amostras superficiais quanto nas amostras fecais estudadas não permite a redução dos níveis de alerta e controle rigoroso da qualidade, tanto da instância governamental quanto de toda a cadeia produtiva. Ao contrário, a não detecção de patógenos no processo produtivo deve servir como estímulo para a busca constante de novas medidas preventivas, como ferramenta para controle da maioria das contaminações microbianas dos alimentos.

A utilização de grupos de indicadores mais específicos como os coliformes, enterobactérias e/ou *E. coli* mostrou-se boa na caracterização da contaminação ao longo do processo de abate, uma vez que a pesquisa destes pode fornecer informações mais concretas sobre a ocorrência de contaminações por fezes, contaminações cruzadas e presença de enteropatógenos, entre outros.

As baixas contagens de micro-organismos indicadores, chegando a níveis não detectáveis pelos métodos utilizados, no último ponto de amostragem, após a lavagem final das carcaças, reforçam mais uma vez a eficiência dos programas de controle e garantia de qualidade da indústria no fornecimento de alimentos inócuos ao consumidor.

REFERÊNCIAS

ABIEC – **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes**. Exportações por ano – 2009. Disponível em < www.abiec.com.br > Acesso em 20/05/2010.

ALONSO S.; MORA A, BLANCO M.; BLANCO J.E.; DAHBI G.; FERREIRO MT.; LÓPEZ C.; ALBERGHINI L.; ALBONETTI S.; ECHEITA A.; TREVISANI M.; BLANCO J. Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. **International Microbiology**. Junho, n°10 (2) p.109-16. 2007.

ANDRADE, B.J. IEPEC – INSTITUTO BRASILEIRO DE ESTUDOS PECUÁRIOS. **1º Levantamento da produção de animais confinados, 2009**. Disponível em < <http://gadodecorte.iepec.com/noticia/1-levantamento-da-producao-de-animaisconfinados> > Acesso em 18/08/2010.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n° 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

ARENAS DE M., L.; HUERTA-LEIDENZ, N.; ORTIZ, Y.; VALERA-MATOS, M.; SMITH, C.G. Microbiological Contamination on Beef Carcasses in a Small Abattoir in Venezuela. **Departmental Research Reports Colorado State University** [online]. Disponível em < <http://ansci.colostate.edu/content/view/51/>. 2004 > Acesso em: 17/11/10.

BARBALHO, T.C.F.; ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA,R.C.C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, v.16, p. 211-216, 2005.

BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; ARTHUR,T.M.; SIRAGUSA, G.R.; KEEN, J.E.; ELDER, R.; LAEGREID, W.W.; KOOHMARAIE, M. Genotypic Analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 Nonmotile Isolates Recovered from Beef Cattle and Carcasses at Processing Plants in the Midwestern States of the United States. **Applied And Environmental Microbiology**, v.67, n 9., p. 3810–3818, 2001.

BARROS, M.A.F. NERO, L.A.; SILVA, L.C., D’OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINE, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, p.591-596, 2007.

BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M. Foodborne disease in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles and trends. **Journal of Food Protection**, v.53. p. 804-817, 1990.

BERCHIERI JUNIOR, A; MACARI M. **Doenças das aves**, 1ª Ed. Campinas: FACTA. pp. 185, 490p., 2000.

BERESFORD, M.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.1000-1005, 2001.

BERSOT, L.S. **Etapas críticas e medidas preventivas para contaminação microbiana no abate de bovinos**. UFPR- Campus de Palotina. Disponível em: < www.spmv.org.br/.../resumo%20Luciano%20Bersot.doc > Acesso em 02/06/2010.

BERSOT, L.S.; GILLIO, C.; TAVOLARO, P.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.3, p.238-240, 2008.

BLACKBURN, C.W.; MCCARTHY, J.D. Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, p.285-290, 2000.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in beef and ready-to-eat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, v.62, p.381-390, 2002.

BOVILL, R.; BEW, J.; COOK, N.; DAGOSTINO, M.; WILKINSON, N.; BARANYI, J. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, p.157-165, 2000.

BRAGA, P. F. S.; MOREIRA, M. D.; ALMEIDA, L. P.; BORGES, T.D. Avaliação microbiológica de carcaças bovinas com vistas à determinação de pontos críticos. In: XII Seminário de Iniciação Científica. Uberlândia-MG, 2008. **Anais do XII Seminário de Iniciação Científica**. Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 Janeiro 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cadeia produtiva da carne bovina** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura; Antônio Márcio Buainain e Mário Otávio Batalha (coordenadores) – Agronegócios ; V8. 86p. Brasília : IICA : MAPA/SPA, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 46, Manual Genérico para APPCC em Indústrias de Produtos de Origem Animal. no **Diário Oficial da União** de 16/03/1998 , Seção1, p. 24 Brasília: M.A.A., 1998. -

BRICHTA-HARHAY,D.M.; GUERINI,M.N.; ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 Contamination on Hides and Carcasses of Cull Cattle Presented for Slaughter in the United States: an Evaluation of Prevalence and Bacterial Loads by Immunomagnetic Separation and Direct Plating Methods **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6289–6297 Vol. 74, No. 20, 2008.

BROSETA, S.M.; BASTIAN, S.N.; ARNÉ, P.D.; CERF., O.; SANAA, M. Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157 : H7. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. Vol. 203, nº 4, p. 347-361, 2001.

BUNCIC, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.173-180, 1991.

CABANES, D.; DEHOUX, P.; DUSSURGET, O.; FRANGEUL, L.; COSSART, P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v.10, n.5, p.238-245, 2002.

CARDOSO, R.L.;ERHARDT, G.;MABONI, F.;SARAIVA, D.L.;WITT, N.M.; VARGAS, A.C. *Salmonella* sp. em subprodutos de origem animal e vegetal de diferentes regiões do Brasil. In: **Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado, 2008.

CARMO, G. M. I.; OLIVEIRA, A. A.; DIMECH, C. P.; SANTOS, D. A.; ALMEIDA, M. G.; BERTO, L. H., ALVES, R. M. S.; CARMO, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, 6: 1-7 Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf > Acesso em: 18/11/2010.

CARNEY, E.; O'BRIEN, S.B.; SHERIDAN, J.J.; MCDOWELL, D.A; BLAIR, I.S.; DUFFY, G. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. **Food Microbiology**, V.23, p.52-59, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). USA Department of health and human services. FoodNet - Foodborne Diseases Active Surveillance Network. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/listeriosis/> > Acesso em: 20/06/2010.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA/CVE – SES-SP. **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água**. Atualização em 26/11/2000. Disponível em: < <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Ecolinet.htm> > Acesso em: 25/06/2010.

CHANG, H-G, H.; TSERENPUNTSAG, B.; KACICA, M.; PERRY F. SMITH, P.F.; MORSE, D.L. Hemolytic Uremic Syndrome Incidence in New York. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 10, Nº. 5, Maio, 2004.

CHAPMAN, P.A.; CÉRDAN, M.A.T.; ELLIN, M.; ASHTON, R.; HARKIN. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.139-150, 2001.

CHESCA, A.C.; POLICARPO DE FREITAS, A.C.; DA SILVEIRA, M.; D'ANGELIS, C.E.M. *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp.:

investigação em carne bovina tipo exportação. **Revista Higiene Alimentar**. V.24, n.184/185, p.133-137, Maio/Junho 2010.

Circular Nº463 – Anexo II/ 2004/DCI/DIPOA. **Programas de autocontroles de estabelecimento habilitados para os Estados Unidos (EUA) e para Estados-Membros da União Européia (UE)**. Brasília, 05 Agosto 2004.

CLIVER, D.O. **Foodborne Diseases**. San Diego: Academic Press, 395p. 1990.

COIA, J.E. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.20, p.1-9, 1998.

COOKSON, A. L.; HAYES, C.M.; PEARSON, G.R., WALES, A.D.; WOODWARD, M.J. Isolation from a sheep of an attaching and effacing *Escherichia coli* O115:H₇ with a novel combination of virulence factors. **Journal Medical Microbiology**. v.51, p-1041–1049, 2002.

CORDANO, A. M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.175-178, 2001.

CULLOR, J.S. Common pathogens that cause foodborne disease: can they be controlled on the dairy? **Veterinary Medicine**, v.2, p.185-194, 1995.

D'AOUST, J.Y. *Salmonella* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers**. 2nd Edition. Washington. DC: ASM Press, 1997. 812p. p.129-158.

D'SILVA, J. Factory farming and developing countries: a compassion in world farming trust briefing. Petersfield: Compassion in World Farming Trust, 2000. Disponível em <<http://www.ciwf.co.uk>> Acesso em: 07 out. 2008.

DESTRO, M.T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.191-196, 2000.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUK, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**., nº2(2), p.110-112, 1991.

DEY, B. P.; LATTUADA, C. P. (Ed.). **Microbiology laboratory guidebook, 3rd Ed.** Washington: United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science Microbiology Division, 1998.

DICKSON, J.S.; MACNEIL, M.D. Contamination of beef tissue surfaces by cattle manure inoculated with *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.54, p.102-104, 1991.

DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. **Infect Immun**, v.59, p.4310–4317, 1991.

DYKES, G.A. Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.301-306, 2003.

DYKES, G.A., MOORHEAD, S.M. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.71-81, 2001.

DYKES, G.A., MOORHEAD, S.M. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, p.161-166, 2000.

DUFFY, G.; CUMMINS, E.; NALLY, P.; O'BRIEN, S.; BUTLER, F. A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. **Meat Science**, Vol. 74, p. 76-88, 2006.

EC – EUROPEAN COMMUNITY – COMMISSION REGULATION n. 471/2001. **Official Journal of the European Union**. L.165, p. 48-53, 8 Junho 2001.

EC – EUROPEAN COMMUNITY – COMMISSION REGULATION n. 1441/2007, amending Regulation (EC) n. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 18p., 5 December 2007.

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

ELDER, R.O.; KEEN, J.E.; SIRAGUSA, G.R.; BARCOCY-GALLAGHER, G.A.; KOOHMARAIE, M.; LAIEGREID, W.W.. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the EUA**. vol. 97, n°. 7, 28/03/2000.

FANTELLI, K.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.63-69, 2001.

FENLON, D.R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **Journal of Applied Bacteriology**, v.59, p.537-543, 1985.

FENLON, D.R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **Journal of Applied Microbiology**, v.81, p.641-650, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos – Guía para las autoridades nacionales de inocuidad de los alimentos. Organización Mundial de Saúde – OMS, Roma, 2007. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/010/a0822s/a0822s00.htm> > Acesso em: 25/05/10.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Roma: 2009. Texto disponível em < <http://www.rlc.fao.org/es/pubs/pdf/sofa09.pdf> > acessado em 11.06.2010.

FONTOURA, C.L. **Estudo microbiológico em carcaças bovinas e influência da refrigeração sobre a microbiota contaminante**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal-SP, 2006.

FRANÇA FILHO, A.T.; MESQUITA, A.J.; OLIVEIRA, J.P.; BUENO, C.P.; LOPES, J.H., COUTO, M.V., BORGES, N.M.F. Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 315-325, jul./set. 2006.

FRANCO, M.P.D.F. HACCP em abate bovino. IEPEC – Instituto de Estudos Pecuários. Gado de Corte. 2010. Disponível em: < <http://www.gadodecorte.iepec.com/noticia/haccp-em-abate-bovino> > Acesso em: 02/06/10.

FRANCO, B.D.G.M.F; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. In: LANDGRAF, M. **Microorganismos indicadores**. Ed. Atheneu, cap.3, p. 27-31, 2008.

FRESCO, L. O.; STEINFELD, H. A food security perspective to livestock and the environment. **FAO Corporet Document Repository**, 1998. Disponível em < www.fao.org/WAIRDOCS/LEAD/X6131E/X6131E00.HTM > Acesso em: 02/06/2010.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.01-15, 2007.

GARCIA, J.A.; DOMINGUEZ, L.; BRIONES, V.; BLANCO, M.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; SUAREZ, G. Revision of the antigenic structure of genus *Listeria*. **FEMS - Microbiology Letters**, Vol.67, p.113-120, 1990.

GERMANO, P.M. L; GERMANO, M.I.S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. In: **Agentes Bacterianos de Toxi-infecções**. 3ªEd. Barueri: Manole, 986p. p.302-323, 2008.

GILL, C.O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: Davies, A.; Board, R. (Eds.) **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998, p. 118-157.

GILL, C.O.; DESLANDES, B.; RAHN, K.; HOUDE, A.; BRYANT, J. Evaluation of the hygienic performances of the processes for beef carcass dressing at 10 packing plants. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 84, n. 6, p. 1050-1058, 1998.

GUERRA, M.M.; BERNARDO, F.A. The risk of listeriosis and hazard identification - A review. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 99 (550), 69-76. 2004.

GUDBJORNSDOTTIR, B.; SUIHKO, M.-L.; GUSTAVSSON, P.; THORKELSSON, G.; SALO, S.; SJOBERG, A.-M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of

Listeria monocytogenes in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, n. 21, p. 217-225, 2004.

GUTH, B.E.C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; CERQUEIRA, A.M.F.; CHILLEMI, G.; ANDRADE, J.R.C.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.335-349, 2003.

HANSSON, I. B. Microbiological meat quality in high- and low-capacity slaughterhouses in Sweden. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 6, p. 820-825, 2001.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, n.1, p.9-18, 1995.

ICMSF – INTERNACIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Guia simplificado para a compreensão e uso de objetivos de inocuidade de alimentos e objetivos de desempenho. 2006. Disponível em: < <http://www.icmsf.iit.edu/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadoPO.pdf> > Acesso em: 04/06/2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*** – Part 1: Detection method, International Standard ISO 11290-1, Geneva, Switzerland, 1996.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*** – Part 2: Enumeration method, International Standard ISO 11290-2, Geneva, Switzerland, 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** – Detection method, International Standard ISO 6579, Geneva, Switzerland, 2002.

JACKSON, C.R., CRAY, P.J., HARO, J.H., MCGLINCHEY, B. Prevalence of *Salmonella* in beef and dairy cattle and potential pathogenicity of their isolates. **Joint Meeting of the ADSA, AMSA, ASAS and PSA**. Bacterial Epidemiology and Antimicrobial Resistance Research. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Resumo. Abril, 2007. Disponível em: < http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=209503 > Acesso em: 20/06/2010.

JARDIM, F. B.B.; SILVA, E. N.; OKURA, M. H., RAMOS, M. A. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.26, n.2, p. 277-282, 2006.

JARDIM, F. B.B.; SILVA, E. N.; RAMOS, M. A. Contagem de micro-organismos indicadores em carcaças bovinas no abate. **Fazu em Revista**. vol.1, n.1, p.21-27, 2004.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Trad. Eduardo César Tondo et al. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAY, J. M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 7.ed. New York: Springer, 2005.

JOHNSTON, A.M. Animal health and food safety. **British Medical Bulletin**, v.56, p.51-61, 2000.

KALAC, P. A review of some aspects of possible association between feeding of silage and animal health. **British Veterinary Journal**, v.138, p.314-315, 1982.

KAPER, J.B., ELLIOTT, S., SPERANDIO, V., PERNA, N.T., MAYHEW, G.F., BLATTNER, F.R. Attaching and effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In: Kaper, J.B., O'Brien, A.D. (Eds.), **Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing E. coli Strains**. A.S.M., Washington, DC, p. 163–182, 1998.

KOTTWITZ, L.; BILL M.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; ALCOGER, I.; FARAH, S.; ABRAHÃO, W. M.; RODRIGUES, D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences** (Online), v. 32, p. 9-15, 2010.

LECUIT, M.; POURNIN, S.V.; LEFORT, J.; HUERRE, M.; GOUNON, P.; DUPUY, C.; BABINET, C.; COSSART, P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. **Science**. v. 292, p.1722-1725, 2001.

LUCHIARI FILHO, A. **Produção de carne bovina no brasil qualidade, quantidade ou ambas?** Trabalho apresentado no II SIMBOI - Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte, Brasília-DF, 29 a 30.04.2006.

MADEN, R.H.; ESPIE, W.E.; MORAN, L.; MCBRIDE, J.; SCATES, P. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in Northern Ireland. **Meat Science**, v.58, p.343-346, 2001.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.207-212, 1998.

MARTINS, L. L.; SANTOS, I. F.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA L. A. T. ; BEZZ, J. Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo "hot dog" comercializadas em embalagens a vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói, RJ/Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. [online], v.67, n.3, p.215-220, 2008.

MASCOLA, L.; SORVILLO, F.; GOULET, V.; WEAVER, R., LINNAN, M. . Fecal carriage of *Listeria monocytogenes*: Observations during a community-wide, common-source outbreak. **Clinical Infectious Disease**, v.15, p.557-558, 1992.

MAZOYER, M. Desigualdades agrícolas e alimentares no mundo: causas e conseqüências. Porto Alegre, 18 Jul. 2003. **Conferência proferida no auditório da Faculdade de Ciências Econômicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Disponível em < <http://www6.ufrgs.br/pgdr/arquivos/522.pdf> > Acesso em: 03/07/10.

MCEVOY, J.M.; DOHERTY, A.M.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; MCDOWELL, D.A. The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, N° 94, p.693–700, 2003.

McEVOY, J.M., SHERIDAN, J.J., BLAIR, I.S. & MCDOWELL, D.A. Microbial contamination on beef in relation to hygiene assessment based on criteria used in EU Decision 2001/471/EC. **Int J Food Microbiol.** v.92, 217–225., 2004.

MCLAUCHLIN, J.; HALL, S.M.; VELANI, S.K.; GILBERT, R.J. Human listeriosis and paté: a possible association. **British Medical Journal**, v.303, p.773-775, 1991.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food related illness and death in the United States. **Emerging Infection Disease**, v.5, p.607-625, 1999.

MORBIDITY MORTALITY WEEKLY REPORTS (MMWR) - CDC. **Listeriosis associated with consumption of turkey franks**. MMWR, v.38, p.267-268, 1989.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, v.1, p.107-121, 2004.

MSTAT-C. **Michigan State University**: Crop and Science Department, 1991. Disponível em: < <https://www.msu.edu/~freed/mstatc.htm> > Acesso em: 20/11/2010.

NESBAKKEN, T.; KAPPERUD, G.; CAUGANT, D.A. Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p.161-171, 1996.

NORRUNG, B.; ANDERSEN, J.K.; SCHLUND, J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, p.195-203, 1999.

NOUICHI, S.; HAMDI, T.M.; Superficial Bacterial Contamination of Ovine and Bovine Carcasses at El-Harrach Slaughterhouse (Algeria). **European Journal of Scientific Research**, v.38 n°3, pp.474-485, 2009.

PAGOTTO, F.; CORNEAU, N.; FARBER, J. *Listeria monocytogenes* infections In: RIEMANN, H.; CLIVER, D. **Foodborne infections and intoxications**. 3.ed. New York, London: Academic Press, cap.9, p.313–340, 2006.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H.S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. Volume I. 1° Ed. (reimpressão). Goiânia: CEGRAF-UFG/Niterói: EDUFF, 1993.

PECCIO A.; AUTIO T.; KORKEALA H.; ROSMINI R.; TREVISANI M. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p. 234-238, 2003.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia, conceitos e aplicações. In: **Doenças Transmitidas por Água e Alimentos**. 2ª Edição, Makron Books, V.2, 1997.

PELL, A.N. Manure and Microbes: Public and Animal Health Problem? **Journal of Dairy Science**, v.80, p.2673-2681, 1997.

PERRY, C.M.; DONNELLY, C.W. Incidence of *Listeria monocytogenes* in silage and its subsequent control by specific and nonspecific antagonism. **Journal of Food Protection**, v.53, p.642-647, 1990.

PETERSEN, L.; MADSEN, M. *Listeria* spp. in broiler flocks: recovery rates and species distribution investigated by conventional culture and the EiaFoss method. **International Journal of Food Microbiology**, v.58, p.113-116, 2000.

PHILLIPS, C.A. The epidemiology, detection and control of *Escherichia coli* O157. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. n°79, p.1367-1381, 1999.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (n°. 46) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology*. Vol. 155, p. 568-570, 2004.

RANGEL, J.M.; SPARLING, P.H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P.M.; SWERDLOW, D.L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 11, N°. 4, Abril, 2005.

RAZZAQ, M.D.S. Hemolytic Uremic Syndrome: An Emerging Health Risk. **American Academy of Family Physicians**. Vol. 74, n°6, p.991-996, 15 de Set., 2006.

REIS, A.O.; CAMARGO, C.V.. Resposta do Teste 14 – *Salmonella* spp. Programa Bristol de Qualidade em Microbiologia Clínica. Laboratório Especial de Microbiologia Clínica de Universidade Federal de São Paulo. SP. Disponível em: < <http://www.unifesp.br/dmed/dipa/lemc/bristolTeste14.htm> > Acesso em: 21/05/10.

RIGOBELLO, E. C.; TAKAHASHI, L.S.; NICODEMO, D.; ÁVILA, F.A.; MALUTA, R.P.; RUIZ, U.S.; STELLA, A.E. **Análise dos genes de virulência de cepas de *Escherichia coli* isoladas de carcaças bovinas**. In: 35º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2008.

ROÇA, R.O. Microbiologia da Carne. Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal- F.C.A – UNESP – Campus de Botucatu-SP. Disponível em < <http://dgta.fca.unesp.br/docentes/roca/carnes/Roca106.pdf> > Acesso em: 02/06/10.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.H.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.197-209, 2000.

RORVIK, L.M.; YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, p.97-104, 1991.

SANAA, M.; POUTREL, B.; MENARD, J.L.; SERIEYS, F. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2891-2898, 1993.

SÃO PAULO, CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água**. Atualização em 26/11/2000. Disponível em: < <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Ecolinet.htm> > Acesso em: 25/06/2010.

SAKATE, R.I.; ARAGON, L.C.; RAGHIANTE, F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.; DESTRO, M.. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Arch. Latinoam. Nutr.**, 53(2), 184-187, 2003.

SCARCELLI, E. & PIATTI, R.M. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.123-127, jul./dez., 2002.

SCHLECH, W.F. *Listeria* gastroenteritis – old syndrome, new pathogen. **N. Engl. J.Med.**, 336. p.130-132, 1997.

SCHMIDT, H., L. BEUTIN, AND H. KARCH. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infect. Immun**, v.63, p-1055–1061, 1995.

SCHMIDT, H.; H. KARCH. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. **J. Clin. Microbiol.** v.34, p.2364– 2367, 1996.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C.V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, p.169-183, 1991.

SCHWACH, E. **Validação do sistema de monitoramento para redução da contaminação microbiana em carcaças bovinas**. Dissertação de mestrado. UNESP –Campus Botucatu – SP, 2007. 53p.

SEELIGER, H.P.R.; HOHNE, K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: BERGAN, T. & NORRIS, J.R. **Methods in Microbiology**, p.31-49. London: Academic Press. 1979.

SIGARINI, C. O. **A avaliação bacteriológica da carne bovina desossada em estabelecimentos comerciais do município de Cuiabá-MT/Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro-RJ, 2004. 95p.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENES, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; LIMA FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Cienc. Saude Coletiva**. V.13, n°5, R.J, Set/Out. 2008.

SILVA JÚNIOR, E.A. **Manual de Controle higiênico-sanitário em alimentos**. Livraria Varela, São Paulo., p.340-342, 1995.

SILVA, N.; SILVEIRA, N.F.A.; CONTRERAS, C; BERAQUET, N.J.; YOKOYA, F; NASCIMENTO, C. A.; OLIVEIRA, V.M.; TSE, C.L. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, 21(2): p.223-227, maio-ago, 2001.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate**. 75p. Tese Mestrado – Departamento de Tecnologia, Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 229p. 2001.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A.; DUVAL, E. H.; JANTZEN, M. M.; TESSMANN, C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de lingüiças mistas do tipo frescal produzidas na cidade de Pelotas (RS). **B.CEPPA**. v. 20, n. .2, p.257-262, jul/dez,. 2002.

SILVEIRA, C.A.; ARRIGONI, M.D.B.; NUNES DE OLIVEIRA, H; COSTA, C.; CHARDULO, L.A.L.; SILVEIRA, L.G.G.; MARTINS, C.L. Produção de novilho superprecoce. In: **Anais do II Simpósio de produção de gado de corte**. Viçosa, MG, 2001.

SIMMONS, N.A. Global perspectives on *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxic *E. coli* spp.: UK views. **Journal of Food Protection**, v.60, p.1463-1465, 1997.

SIRAGUSA, G.R.; DICKSON, J.S.; DANIELS, E.K. Isolation of *Listeria* spp. from feces of feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, v.56, p102-105/109, 1993.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: Ryser, E.T.; Marth, E.H. Ed. **Listeria, Listeriosis and Food Safety: Food Science and technology**. New York: Marcel Dekker, p 75-95, 1999.

STROCKBINE, N.A.; JACKSON, M.P.; SUNG, L.M.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. **Journal of Bacteriology**. v.170, p.1116–1122, 1988.

SYNGE, B.A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a veterinary view. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.31S-37S, 2000.

TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Early events and pattern formation in *Listeria monocytogenes* biofilmes. **Biofilms**, v.1, p.351-359, 2004.

TAVARES, T.M. & SERAFINI, A.B. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo trailers em Goiânia (GO). **Revista de patologia Tropical**. Vol.32 P.45-52 jan-jun 2003.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, p.315-322, 1996.

TODAR, KENNETH. *Salmonella* and Salmonellosis. - **Todar's online textbook of bacteriology**. Publicação *online*. Wisconsin, EUA, 2008. Disponível em < www.textbookofbacteriology.net/salmonella.html > Acesso em 30/09/09.

TRINDADE, P. S.; NALERIO, E. S.; PEGORARO, M. R. P.; JANTZEN, M.; ZOCHE, F.; ARAÚJO, M. R.; LIMA, A. S.; SILVA, W. P. ***Salmonella* spp. em derivados cárneos comercializados na cidade de Pelotas-RS**. Trabalho apresentado no XIII Congresso de Iniciação científica da Universidade Federal de Pelotas, RS, 2004.

TUTENEL, A.V.; PIERARD, D.; VAN HOOF, J.; CORNELIS, M.; DE ZUTTER, L. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle, pigs and chicken at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.63-69, 2003.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Food Safety and Inspection Service. Recommendations by the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods: The ecology of *Listeria monocytogenes*, USDA, FSIS, Washington, D.C. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, p.194-201, 1991.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Food Safety and Inspection Service. **Nationwide beef microbiological baseline data collection program: cows and bulls**. USDA, FSIS, Washington, D.C. 33p.,1996a.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Food Safety and Inspection Service. **Pathogen Reduction / Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems / Specific Sample Collection Procedure CRF / Part 304, Rules and Regulations 38931**, Washington: USDA, v. 144, n. 61, 1996b.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Microbiology Laboratory Guide Book. **Isolation and Identification of *Salmonella* from from Meat, Poultry and Egg Products**. USDA, FSIS, Washington, D.C, 2008. Disponível em: < [www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological Lab Guidebook](http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook) > Acesso em: 02/10/09.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Foreign Agricultural Service. Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. USDA, FSIS, Washington, D.C. Abril, 2010. Disponível em: < www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf > Acesso em 20/05/10.

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