

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências e
Tecnologia Agroindustrial



Dissertação

**OCORRÊNCIA DE *Listeria* spp., *Escherichia coli* O157:H7 E MICRO-
ORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE DURANTE AS ETAPAS DE
ABATE DE BOVINOS E NO AMBIENTE DE PROCESSAMENTO DE CORTES**

Mauricéia Greici de Oliveira

Pelotas, 2011



**Ocorrência de *Listeria* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e micro-organismos indicadores de
higiene durante as etapas de abate de bovinos e no ambiente de processamento de cortes**

Mauricéia Greici de Oliveira

2011

Mauricéia Greici de Oliveira

OCORRÊNCIA DE *Listeria* spp., *Escherichia coli* O157:H7 E MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE DURANTE AS ETAPAS DE ABATE DE BOVINOS E NO AMBIENTE DE PROCESSAMENTO DE CORTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Microbiologia de Alimentos).

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Prof^a. Dr^a. Ana Eucares von Laer

Pelotas, 2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA FONTE:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

O48o Oliveira, Mauricéia Greici de
Ocorrência de *Listeria* spp., *Escherichia coli* 0157:
H7 e microorganismos indicadores de higiene durante
as etapas de abate de bovinos e no ambiente de
processamento de cortes / Mauricéia Greici de Oliveira
; orientador Wladimir Padilha da Silva e Ana Eucares
Von Laer. - Pelotas, 2011.-109f. ; il.- Dissertação (
Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia
Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas.
Pelotas, 2011.

*“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco;
à medida que vamos adquirindo conhecimentos,
instala-se a dúvida”
(Johan Goethe)*

Banca examinadora:

Pesquisadora Dr^a. Élen Silveira Nalério, Embrapa Pecuaria Sul

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini, Universidade Federal de Pelotas

Prof^o. Dr. Wladimir Padilha da Silva, Universidade Federal de Pelotas

*À minha mãe e ao meu pai, aos
quais reservo amor sem igual,
eu dedico.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Renato e Rosalete, pelo apoio incondicional. Não há palavras que retratem meu amor e meu orgulho. É mérito de vocês tudo que sou hoje. Vocês sempre foram meu referencial. É em vocês que eu me espelho... todos os dias...

Ao Glé, meu irmão, meu amigo. É sempre bom estar em casa rindo desse teu jeito brincalhão. “A gente briga, a gente chora mas a gente se ama, a gente se ama...”

A toda minha família, em especial, as minhas tias, que sempre vibram comigo, a cada objetivo alcançado.

Ao Viguinho que desde a graduação, por inúmeras vezes, acreditou mais na minha capacidade que eu mesma, me dando apoio e me lembrando que tudo vai dar certo.

Ao professor Wladimir, pela amizade, incentivo e principalmente, por acreditar na minha capacidade e confiar no meu trabalho, contribuindo para meu amadurecimento profissional.

A minha co-orientadora e amiga Ana, que mesmo a distância, por emails e telefonemas, colaborou na realização desse Projeto.

A Tatiane, minha amiga e coleta de trabalho. Nossa parceria deu certo. Foi muito bom dividir contigo, as inúmeras responsabilidades que o Projeto MAPA exigiu durante esse dois anos.

A Família Microbial que me acolheu amigavelmente desde o primeiro dia no Laboratório. A vocês, Júlia, Dê, Mi, Carol, Andréia, Élen, Márcia, Karla, Rodrigo, Valmor, Kátia, Vagna, Prof. Ângela, Prof. Celso, Vanessa e Guilherme, obrigada pelas conversas e risadas garantidas todos os dias, pelo incentivo, pela companhia e pela amizade... Como eu já dizia “Bom mesmo é parar e ver que seus colegas de trabalho não são apenas, colegas de trabalho”.

Às estagiárias Janaína do Cefet, Simone, Joline e Janaína Viana, que trabalharam incansavelmente na realização desse Projeto. Sem vocês, esse trabalho não seria possível.

À querida Vanessa que aguardava ansiosa a cada nova coleta. Não há dúvida que teu trabalho foi indispensável durante a realização desse Projeto.

Ao secretário Marcos, pelo seu profissionalismo, dedicação, agilidade e amizade.

As inesquecíveis amigas da graduação, Jó, Lidi, Mi e Rê, por tantos momentos bons vividos juntos. Como já dizíamos, tem coisas na vida que são pra sempre.

As amigas do apartamento, Fernanda Carini, Fernanda Cecote, Ângela e Simone, pelas torradas divididas diariamente, pelas risadas e pela amizade... Em especial, a Ale, minha amiga-irmã, cuja companhia me faz falta.

A Priscila Álvares da USP pela PCR das cepas de *E. coli* e ao Leonardo da Biotecnologia, pelo empréstimo do imunosseparador magnético.

Aos laboratórios de Melhoramento Vegetal e Parasitologia, pela utilização das centrifugas.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo financiamento desse projeto.

A Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Rio Grande do Sul (SEAPA - RS) pela colaboração na realização das coletas.

À Universidade Federal de Pelotas/FAEM/DCTA pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho...

Muito Obrigada!

RESUMO

OLIVEIRA, M. G. **Ocorrência de *Listeria spp.*, *Escherichia coli* O157:H7 e micro-organismos indicadores de higiene durante as etapas de abate de bovinos e no ambiente de processamento de cortes.** 2011. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Carnes e derivados cárneos estão frequentemente associados a surtos de DTA, uma vez que representam excelentes meios para o crescimento microbiano, podendo inclusive, ser facilmente contaminadas durante as etapas de abate dos animais. Assim, após o abate, a carne passa a apresentar uma microbiota bastante variável, já que se torna sujeita a contaminações provenientes de diferentes fontes. A forma mais efetiva de garantir que os produtos cárneos sejam produzidos de acordo com padrões de qualidade e inocuidade é através do monitoramento constante nas etapas do processo. Nesse contexto, objetivou-se verificar a ocorrência e o nível de contaminação de carcaças bovinas em relação à *Listeria spp.*, *E. coli* O157:H7 e micro-organismos indicadores de higiene em linhas de abate e em ambiente de processamento dos cortes. A tomada de amostras foi realizada em dois Frigoríficos com distintos níveis de inspeção, localizados na região sul do Rio Grande do Sul. Foram amostradas 60 carcaças, das quais 22 foram coletadas no Frigorífico A e 38 no Frigorífico B. A amostragem das carcaças foi conduzida utilizando-se a técnica de esfregaço de superfície (Esponjas 3M™), aplicada na região do peito do animal, durante o abate em quatro pontos críticos do processo (após as etapas de sangria, esfolagem, evisceração e lavagem pré-resfriamento). A amostragem do ambiente de processamento foi realizada somente no Frigorífico B, onde foram coletadas amostras de facas, mesas, serras e mãos dos manipuladores, bem como, de cortes finais (filé e alcatra). As análises de *Listeria spp.* e *E. coli* O157:H7 foram realizadas conforme metodologia preconizada pelas ISO 11.290-1 e ISO 16654, com modificações. As concentrações de coliformes totais e *E. coli* foram determinadas empregando-se placas de Petrifilm™ EC. No Frigorífico A, *L. innocua* foi isolada com maior frequência na etapa após a sangria (31,8%), sendo que o micro-organismo não foi identificado nas etapas subsequentes da linha de abate. Ainda que a ocorrência de *Listeria spp.* no Frigorífico B, tenha sido menos expressiva após a lavagem pré-resfriamento (8,3%) quando comparada com a etapa de sangria, destaca-se a presença de *L. monocytogenes* verificada nesse ponto, demonstrando a necessidade de reavaliação dos processos operacionais. Além disso, o patógeno foi isolado nas amostras de mesa e faca antes do início das atividades, e mesa durante as operações de corte, despertando grande preocupação pela possibilidade de incorporação do micro-organismo no produto final. A presença de *L. innocua* verificada na faca e mesa antes de iniciar o processamento, bem como, nas mãos durante as operações de corte, demonstra o potencial do manipulador como carreador de micro-organismos. As etapas na linha de abate e o ambiente de processamento, não mostraram ser um fator de risco em relação à contaminação por *E. coli* O157:H7, haja vista que o patógeno não foi isolado nesses pontos de amostragem. Considerando os resultados obtidos para os micro-organismos indicadores, observou-se que nos dois estabelecimentos, as concentrações médias verificadas após a etapa de lavagem das carcaças, denotaram resultados satisfatórios. Observou-se ainda, que as amostras positivas para *L. monocytogenes* apresentaram baixas contagens de coliformes totais e *E.*

coli, inferindo que a redução da microbiota competidora favoreceu o desenvolvimento do patógeno.

Palavras-chaves: Contaminação microbiana. Abate de bovinos. Ambiente de processamento. Cortes finais.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. G.. **Occurrence of *Listeria* spp., *E. coli* O157: H7 and hygiene indicating micro-organisms during the phases of cattle slaughter and in the cutting processing environment.** 2011. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Meat and meat products are often associated with outbreaks of DTA, since they represent excellent means for microbial growth and may even be easily contaminated during the stages of animal slaughter. So, after slaughter, the meat starts presenting quite a variable microflora, since it becomes subject to contamination from various sources. The most effective way to ensure that meat products are produced according to standards of quality and safety is through constant monitoring in the process steps. In this context, this experiment aimed at verifying the occurrence and level of contamination of cattle carcasses in relation to *Listeria* spp., *E. coli* O157: H7 and micro-organisms indicators of the hygienic slaughter line and in the processing environment of the cuts. The taking of samples was performed in two abattoirs with different levels of inspection, located in southern Rio Grande do Sul. 60 carcasses were sampled, 22 of which were collected in the Abattoir A and 38 in the Abattoir B. Sampling of carcasses was conducted using the technique of surface smearing (Sponges 3MTM), applied on the chest of the animal, during slaughter in four critical points in the process (after the steps of bleeding, skinning, gutting and washing pre-cooling). A sampling of the processing environment was performed only in the Abattoir B, where samples of knives, tables, saws and handlers, as well as the final cuts (fillet and rump) were collected. The analysis of *Listeria* spp. and *E. coli* O157: H7 were performed according to methodology recommended by ISO 11290-1 and ISO 16654, with modifications. Concentrations of total coliform and *E. coli* were determined employing PetrifilmTM EC plates. In the Abattoir A, *L. innocua* was isolated more frequently (31,8%), in the step after the bloodletting, but the micro-organism was not detected in subsequent steps of the slaughter line. Although the incidence of *Listeria* spp. Abattoir in B, was less pronounced after pre-cooling washing (8.3%) when compared with the step of bleeding, the presence of *L. monocytogenes* observed in this step is highlighted, demonstrating the need for reassessment of operational processes. Moreover, the pathogen was isolated in samples of table and knife before the start of the activities, and the table during cutting operations, arousing great concern about the possibility of incorporating the micro-organism in the final product. The presence of *L. innocua* found in the knife and the table before starting the processing, as well as in the hands during cutting operations, demonstrates the potential of the handler as a carrier of micro-organisms. The steps in the slaughter line and the processing environment, did not seem to be a risk factor concerning contamination by *E. coli* O157: H7, considering that the pathogen was not isolated in these sampling points. Considering the results obtained for the indicating micro-organisms, it was observed that in the two establishments, the average concentrations observed after the washing of carcasses, represented satisfactory results. We also observed that the positive samples for *L. monocytogenes* showed low amounts of coliform and *E. coli*, implying that the reduction of competing microflora favored the development of the pathogen.

Keywords: Contamination. Cattle slaughtering. Processing environment. Final cuts.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Estrutura de uma Análise de Risco.....	23
Figura 2 -	Representação esquemática da transmissão de <i>L. monocytogenes</i> entre habitat e hospedeiros.....	30
Figura 3 -	Pontos de amostragem na linha de abate de bovinos.....	39
Figura 4 -	Esquema representativo de carcaças bovinas antes (A) e após (B - na meia carcaça direita) divisão em duas meias carcaças, com indicação dos pontos (*) onde foram coletadas as amostras de superfície das carcaças.....	40
Figura 5 -	Espécies de <i>Listeria</i> isoladas em carcaças bovinas avaliadas durante as etapas de abate nos Frigoríficos A e B.	49
Figura 6 -	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. após as etapas de sangria, esfolagem, evisceração e lavagem pré-resfriamento na linha de abate de bovinos, nos Frigoríficos A e B.....	51
Figura 7 -	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. nas etapas de abates de bovinos abatidos no Frigorífico A.....	51
Figura 8 -	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. nas etapas de abates de bovinos abatidos no Frigorífico B.....	51
Figura 9 -	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. no ambiente de processamento de cortes amostrados no Frigorífico B.....	55
Figura 10 -	Presença de <i>Listeria innocua</i> nos cortes finais de filé e alcatra amostrados no Frigorífico B.....	55
Figura 11 -	Micro-organismos identificados pelo Enterokit-B nas etapas de abate de bovinos no Frigorífico A.....	58
Figura 12 -	Micro-organismos identificados pelo Enterokit-B nas etapas de abate de bovinos no Frigorífico B.....	58
Figura 13 -	Micro-organismos identificados pelo Enterokit-B no ambiente de processamento e nos cortes cárneos embalados à vácuo no Frigorífico B.....	63
Figura 14 -	Contagens médias de <i>E. coli</i> a 35(±1)°C na superfície de carcaças bovinas abatidas no Frigorífico A, durante as operações de sangria (P1), esfolagem (P2), evisceração (P3) e lavagem pré-resfriamento (P4).....	65

Figura 15 - Contagem médias de coliformes totais a 35(±1)°C na superfície de carcaças bovinas no Frigorífico A, durante as operações de sangria (P1), esfolia (P2), evisceração (P3) e lavagem pré-resfriamento (P4).....	66
Figura 16 - Contagens médias de <i>E. coli</i> a 35(±1)°C na superfície de carcaças bovinas abatidas no Frigorífico B, durante as operações de sangria (P1), esfolia (P2), evisceração (P3) e lavagem pré-resfriamento (P4).....	66
Figura 17 - Contagens médias de coliformes totais a 35(±1)°C na superfície de carcaças bovinas no Frigorífico B, durante as operações de sangria (P1), esfolia (P2), evisceração (P3) e lavagem pré-resfriamento (P4).....	67
Figura 18 - Contagens médias de <i>E. coli</i> no ambiente e em cortes cárneos amostrados no Frigorífico B: P1 (Mesa Antes do Processamento), P2 (Mesa Durante o Processamento), P3 (Faca Antes do Processamento), P4 (faca Durante o Processamento), P5 (Serra A, de abertura do esterno), P6 (Serra B, de divisão das carcaças), P7 (Mão antes do Processamento), P8 (Mão Durante o Processamento), P9 (Alcatra) e P10 (Filé).....	72
Figura 19 - Contagens médias de coliformes totais no ambiente e cortes cárneos amostrados no Frigorífico B: P1 (Mesa Antes do Processamento), P2 (Mesa Durante o Processamento), P3 (Faca Antes do Processamento), P4 (faca Durante o Processamento), P5 (Serra A, de abertura do esterno), P6 (Serra B, de divisão das carcaças), P7 (Mão antes do Processamento), P8 (Mão Durante o Processamento), P9 (Alcatra) e P10 (Filé).....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Características fenotípicas e bioquímicas utilizadas na discriminação de <i>Listeria</i> spp.....	27
Tabela 2 -	Amostras coletadas no ambiente de processamento.....	41
Tabela 3 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para identificação dos fatores de virulência de <i>E. coli</i> O157:H7.....	47
Tabela 4 -	Frequência de isolamento de <i>Listeria</i> spp. após as etapas de sangria, esfola, evisceração e lavagem pré-resfriamento das carcaças no abate de bovinos nos Frigoríficos A e B.....	50
Tabela 5 -	Perfil genotípico dos isolados de <i>E. coli</i> - sorbitol-negativa oriundos da etapa de sangria do Frigorífico B.....	59
Tabela 6 -	Contagens médias de <i>E. coli</i> (log UFC.cm ⁻²) verificadas após as operações de sangria, esfola, evisceração e lavagem das carcaças nos Frigoríficos A e B.....	67
Tabela 7 -	Contagens médias (log UFC.cm ⁻²) de coliformes totais verificadas após as operações de sangria, esfola, evisceração e lavagem das carcaças nos Frigoríficos A e B.....	68
Tabela 8 -	Contagens médias de <i>E. coli</i> e de coliformes totais (log UFC.cm ⁻² para superfícies e log UFC.mão ⁻¹ para as mãos) no ambiente de processamento e em cortes cárneos amostrados no Frigorífico B.....	73

Lista de Abreviaturas e Siglas

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos
P1 - Ponto de amostragem após a Sangria
P2 - Ponto de amostragem após Esfolia
P3 - Ponto de amostragem após Evisceração
P4 - Ponto de amostragem após Lavagem pré-resfriamento
IMS - Técnica de Separação Imunomagnética
STEC - *Escherichia coli* produtoras da Toxina de Shiga
VTEC - *Escherichia coli* verotoxigênicas
ETEC - *Escherichia* enterotoxigênicas
EHEC - *Escherichia* entero-hemorrágicas
EPEC - *Escherichia* enteropatogênicas
EAaggEC - *Escherichia* enteroagregativas
EIEC - *Escherichia* enteroinvasivas
DAEC - *Escherichia* difusamente aderentes
LEE - *Locus of Enterocyte Effacement*
SNP - *Single polymorfism nucleotide*
VT – Verotoxinas
SUH - Síndrome Urêmica Hemolítica
Stx1 - Toxina de Shiga tipo 1
Stx2 - Toxinas de Shiga tipo 2
lesão A/E (*attaching and effacing*).
eaeA - gene codificador da intimina
uidA - gene codificador da β -glucuronidase
ehxA - gene codificador da entero-hemolisina
stx1 - gene codificador da Toxina de Shiga tipo 1
stx12 - gene codificador da Toxina de Shiga tipo 2
L. monocytogenes - *Listeria monocytogenes*
L. innocua - *Listeria innocua*
L. welshimeri – *Listeria welshimeri*
L. gray – *Listeria gray*
EPM – Produção de gás, H₂S, urease, L-triptofano desaminase
MILI - Motilidade Indol Lisina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
OBJETIVOS.....	19
1. Objetivo geral.....	19
2. Objetivos específicos.....	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1. Contaminação da carne bovina.....	20
2. Avaliação de Risco Microbiológico.....	22
3. Micro-organismos de relevância na carne bovina.....	23
3.1 <i>Listeria</i> spp.....	25
3.1.1 Classificação.....	25
3.1.2 Características.....	26
3.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> e listeriose.....	27
3.1.4 Habitat e transmissão.....	29
3.2 <i>Escherichia coli</i>	30
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga (STEC).....	32
3.2.1.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	33
3.2.1.1.1 Fatores de Virulência.....	34
3.3 Micro-organismos indicadores de higiene.....	36
MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
1. Abatedouros-Frigoríficos.....	38
2. Processo de Amostragem.....	38
2.1 Amostragem das carcaças.....	38

2.2 Amostragem do Ambiente de Processamento.....	40
2.3 Amostragem dos cortes cárneos (Filé mignon e Alcatra).....	42
3. Análises Microbiológicas.....	42
3.1 Isolamento e identificação de bactérias do gênero <i>Listeria</i>	42
3.2 Detecção de <i>E. coli</i> O157:H7.....	44
3.3 Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene.....	47
3.4 Análise Estatística.....	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
1. Ocorrência de <i>Listeria</i> spp.....	49
1.1 Carcaças Bovinas.....	49
1.2 Ambiente de processamento e cortes cárneos embalados a vácuo.....	54
2. Ocorrência de <i>E. coli</i> O157:H7.....	57
2.1 Carcaças Bovinas.....	57
2.2 Ambiente de processamento e cortes cárneos embalados a vácuo....	63
3. Micro-organismos Indicadores de Higiene.....	65
3.1 Carcaças Bovinas.....	65
3.2 Ambiente de processamento e cortes cárneos embalados a vácuo.....	71
4. Relação entre a presença de <i>L. monocytogenes</i> e micro-organismos indicadores de higiene.....	76
CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

INTRODUÇÃO

Os principais alimentos associados a surtos e casos esporádicos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são as carnes e seus derivados (RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009) porque representam excelentes meios para o crescimento microbiano, devido à variedade de nutrientes, à alta atividade de água e à baixa acidez (ICMSF, 2005). Além disso, a carne pode ser facilmente contaminada durante as etapas de abate dos animais (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006).

Essa contaminação pode ocorrer em todas as operações de abate, armazenamento e distribuição, e sua intensidade depende da eficiência das medidas higiênicas adotadas (FILHO et al., 2006). Assim como a sangria, a esfolagem constitui um ponto crítico do abate (PRATA, 2009), tendo em vista as possibilidades de contaminação da superfície das carcaças a partir de micro-organismos presentes na pele, pêlos e cascos dos animais (FONTOURA, 2006). Aliado a isso, os micro-organismos podem contaminar a carcaça durante a evisceração, devido ao contato com conteúdo gastrointestinal e à contaminação oral esofágica (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 2006; JARDIM et al. 2006) e também, através de utensílios utilizados no abate, mãos e roupas de operários, água utilizada para lavagem e equipamentos presentes na linha de processamento (ROÇA, 2004; BARROS et al., 2004; FERRONATO, 2010).

A Organização Mundial do Comércio, através do Acordo Sanitário e Fitossanitário, e a Organização Mundial da Saúde, em 1995, passaram a recomendar a aplicação de uma nova ferramenta para avaliar o impacto dos micro-organismos contaminantes de alimentos na saúde da população, chamada Análise de Risco (CODEX ALIMENTARIUS, 1999). Por analisar os riscos desde a obtenção da matéria-prima até o consumo, essa ferramenta permite identificar os pontos críticos dos quais são necessárias informações constantes, fornecendo subsídios necessários para a organização das estratégias de gestão, ou seja, das medidas necessárias para controlar e reduzir os riscos associados a um alimento específico (SANTANA; FRANCO, 2009).

Nesse sentido, 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 Comunidade Européia, por exemplo, determina a enumeração de aeróbios mesófilos e enterobactérias, além de pesquisa de *Salmonella* spp., em carcaças bovinas como medidas de verificação da qualidade microbiológica do processo de abate (Comission Regulation - EC, 2007).

As bactérias do grupo coliformes, principalmente *Escherichia coli*, são em geral, associados à contaminação por matéria fecal e sugerem a presença de patógenos de origem entérica (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Contudo, apesar de alguns micro-organismos indicadores sugerirem a presença de certos perigos microbiológicos, a pesquisa efetiva de determinados patógenos é fundamental para a garantia da segurança de produtos cárneos, e exigência de muitos mercados consumidores, principalmente externos.

Com relação aos produtos cárneos há consenso internacional de que os patógenos de maior relevância são *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (ICMSF, 2005; COSTA, 2010; SOFOS; GEORNARAS, 2010).

Entre os mais importantes micro-organismos causadores de infecções alimentares, destaca-se *L. monocytogenes*. O micro-organismo é o agente etiológico da listeriose, doença grave que possui elevada taxa de letalidade (entre 20% - 30%) (MANTILLA et al., 2007) e que afeta preferencialmente, indivíduos suscetíveis como mulheres grávidas, recém-nascidos e pessoas com o sistema imunológico debilitado, incluindo idosos (COSSART; TOLEDO-ARANA, 2008; JIANG et al., 2008).

E. coli produtoras de toxina de Shiga (STEC) são reconhecidas como um importante grupo de patógenos emergentes e tornam-se um grande desafio à saúde pública, por causarem severas DTA (GARVEY et al., 2009; SÁNCHEZ et al., 2010a). Dentre as STEC destaca-se o sorotipo O157:H7 que tem sido associado a surtos e casos esporádicos de colite hemorrágica e Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH) (ERICKSON; DOYLE, 2007; GARVEY et al., 2009).

Dada a importância que a carne apresenta na alimentação humana, associada à necessidade de oferecer um alimento inócuo, a investigação e caracterização de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, além da utilização de micro-organismos indicadores, em carnes e derivados cárneos, é relevante (NALÉRIO et al., 2009; FERRONATTO, 2010; ETCHEVERRÍA et al., 2010; SASAKI et al., 2010; PRENDERGAST et al., 2011).

Portanto, estudos epidemiológicos que identifiquem com precisão a origem da contaminação de cepas potencialmente patogênicas, são fundamentais para garantir a qualidade e segurança microbiológica de produtos cárneos. A partir desses dados é possível propor medidas de controle e eliminação desses patógenos em pontos específicos da linha de abate e processamento, garantindo dessa forma a qualidade e inocuidade dos produtos cárneos finais.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Verificar a ocorrência e o nível de contaminação de carcaças bovinas em relação à *Listeria spp.*, *E. coli* O157:H7 e micro-organismos indicadores de higiene em linhas de abate e em ambiente de processamento dos cortes.

2. Objetivos específicos

Avaliar a influência das etapas de sangria, esfolagem, evisceração e lavagem pré-resfriamento, na contaminação das carcaças bovinas em relação à presença de *Listeria spp.*, *E. coli* O157:H7 e micro-organismos indicadores de higiene, em dois Frigoríficos com distintos níveis de inspeção;

Verificar a ocorrência de *Listeria spp.*, *E. coli* O157:H7 e micro-organismos indicadores de higiene, no ambiente de processamento dos cortes no Frigorífico de Inspeção Estadual (Frigorífico B), avaliando o papel desses pontos como potenciais fontes de contaminação do produto final (filé e alcatra);

Avaliar a relação entre a presença de *Listeria spp.* e *E. coli* O157:H7 com a contagem de micro-organismos indicadores de higiene (coliformes totais e *E. coli*) nas carcaças bovinas, ambiente de processamento e cortes finais (filé e alcatra).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Contaminação da carne bovina

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) constituem um grande problema de saúde pública, tanto no Brasil como nos demais países, sendo responsáveis por elevados custos econômicos e sociais (WELKER et al., 2010). Entre as causas mais frequentes de contaminação, destacam-se a manipulação e a conservação inadequadas dos alimentos, além da contaminação cruzada entre produtos crus e processados (MÜRMANN et al. 2008; GREIG; RAVEL, 2009).

Os principais alimentos associados a surtos e casos esporádicos de DTA são as carnes e seus derivados (HUGHES; GILLESPIE; O'BRIEN, 2007; RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009). Segundo Welker et al. (2010), 36% dos surtos ocorridos no Rio Grande do Sul entre 2006 e 2007, decorreram da ingestão de produtos cárneos contaminados, seguidos de pratos preparados (20%) e saladas (15%). O autor verificou ainda, que entre os produtos cárneos, os principais alimentos envolvidos foram carne bovina (39%), carne de frango (30%) e embutidos (17%). Carne suína e pescados representaram juntos, 14% das amostras contaminadas.

O desenvolvimento e o avanço tecnológico na produção e industrialização de carnes e produtos cárneos, resultaram em melhorias consideráveis nas condições higiênicas encontradas nestes alimentos. Contudo, apesar de inúmeros avanços, as doenças de origem alimentar continuam ocorrendo (CALLAWAY et al., 2008). Produtos cárneos estão frequentemente associados a surtos de dta, uma vez que representam excelentes meios para o crescimento microbiano, devido à variedade de nutrientes, à alta atividade de água e à baixa acidez (ICMSF, 2005). Além disso, a carne pode ser facilmente contaminada durante as etapas de abate dos animais (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006).

No Brasil, segundo dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica, no período de 1999 a 2008, de um total de 3.984 surtos investigados, 12% estiveram associados ao consumo de carnes vermelhas (BRASIL, 2010). Recentemente, o trabalho de Greig e Ravel (2009) também apontou que alimentos com vários ingredientes, como por exemplo, ovos e carne foram os mais envolvidos em DTA.

O tecido muscular de animais sadios é considerado, em situações normais, estéril, isento de qualquer micro-organismo. Após o abate a carne passa a apresentar uma microbiota bastante variável, uma vez que pode se tornar sujeita a contaminações provenientes de diferentes fontes (GILL, 1998; BORCH; ARINDER, 2002).

Essa contaminação pode ocorrer em todas as operações de abate, armazenamento e distribuição, e sua intensidade depende da eficiência das medidas higiênicas adotadas (FILHO et al., 2006). Segundo Roça (2004), um dos contaminantes potenciais da carne é o contato da carcaça com o conteúdo gastrointestinal decorrente de falhas nos processos operacionais.

Assim como a sangria, a esfolação constitui um ponto crítico do abate (PRATA, 2009), tendo em vista as possibilidades de contaminação da superfície das carcaças a partir de micro-organismos presentes na pele, pêlos e cascos dos animais (FONTOURA, 2006). Segundo Varela-Hernández et al. (2007), o contato da carcaça com o couro do animal reveste-se de uma fonte potencial de contaminações. Gill (2004) observou que a lavagem dos animais antes do abate reduz consideravelmente a carga microbiana inicial presente no couro.

De acordo com Bosilevac et al. (2009), as taxas de contaminação das carcaças, após a esfolação, estão diretamente relacionadas com os níveis de contaminação que entram no abatedouro, evidenciando que o ambiente dos currais de espera também estão relacionados com a carga de bactérias presentes no couro (ARTHUR et al., 2008).

Durante a evisceração e a inspeção *post-mortem*, pode ocorrer disseminação de bactérias para carcaças e vísceras devido às incisões praticadas. Micro-organismos podem contaminar a carcaça durante a evisceração devido ao contato com conteúdo gastrointestinal e à contaminação oral esofágica (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 2006; JARDIM et al., 2006). Considerando que as fezes são as principais fontes de contaminação que podem atingir a carcaça por deposição direta, e até mesmo por contato indireto (BORCH; ARINDER, 2002), torna-se necessária a adoção de práticas higiênico-sanitárias e cuidados tecnológicos, visando não perfurar o tubo gastrointestinal.

Pesquisas evidenciam ainda, que a contaminação pode ocorrer, através de utensílios utilizados no abate, mãos e roupas de operários, água utilizada para lavagem e equipamentos presentes na linha de processamento (ROÇA, 2004;

BARROS et al., 2004; FERRONATO, 2010). Portanto, a forma mais efetiva de garantir que os produtos cárneos sejam produzidos de acordo com padrões de qualidade e inocuidade é através do monitoramento constante nas etapas do processo (PARDI et al., 2006).

2. Avaliação de Risco Microbiológico

A Organização Mundial do Comércio, através do Acordo Sanitário e Fitossanitário, e a Organização Mundial da Saúde, em 1995, passaram a recomendar a aplicação de uma nova ferramenta para avaliar o impacto dos micro-organismos contaminantes de alimentos na saúde da população, chamada Análise de Risco (CODEX ALIMENTARIUS, 1999). Segundo esse Acordo, o Codex Alimentarius passou a ser o fórum encarregado de fornecer os subsídios necessários para que as avaliações de riscos assegurem práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos.

No contexto atual, a avaliação de risco é uma ferramenta objetiva que visa ajustar as regulamentações de higiene e segurança dos alimentos, e determinar a efetividade das práticas de gestão dos riscos adotadas (SANTANA; FRANCO, 2009). Segundo os autores, o desenvolvimento e a melhor aplicação da análise de risco, resultam na adoção de medidas de controle dos perigos baseadas em critérios praticáveis, impactando positivamente na redução de problemas relacionados à inocuidade dos alimentos devido aos micro-organismos patogênicos.

Segundo a definição clássica do Codex Alimentarius, uma análise de risco é composta por três componentes: avaliação do risco, gestão do risco e comunicação do risco (Fig. 1). Através de uma Análise de Risco, identifica-se um problema, avalia-se sua gravidade, consideram-se as alternativas de gestão possíveis, seleciona(m)-se a(s) alternativa(s) mais adequada(s), implementa(m)-se essa(s) alternativa(s) de gestão e avalia-se seu impacto na solução do problema (DENNIS et al., 2008).



Figura 1 - Estrutura de uma Análise de Risco (CODEX ALIMENTARIUS, 1999).

Embora cada componente da análise de risco tenha objetivos distintos, as atividades são integradas, com a participação de todos os envolvidos no processo, sendo um processo sistemático e transparente (WHITING; BUCHANAN, 2008).

Por analisar os riscos desde a obtenção da matéria-prima até o consumo, essa ferramenta permite identificar os pontos críticos dos quais são necessárias informações constantes, fornecendo subsídios necessários para a organização das estratégias de gestão, ou seja, das medidas necessárias para controlar e reduzir os riscos associados a um alimento específico (SANTANA; FRANCO, 2009).

Na maioria dos países, inclusive no Brasil, avaliações de risco são difíceis de serem realizadas devido às inúmeras lacunas, com destaque para a fragilidade dos dados epidemiológicos sobre a prevalência e características das enfermidades transmitidas pelos alimentos no país. Soma-se a essa deficiência, a insuficiência de dados quantitativos a respeito da prevalência dos micro-organismos patogênicos de relevância na cadeia produtiva de alimentos, bem como, de dados sobre as características de virulência desses micro-organismos e seu comportamento nos alimentos durante armazenamento, transporte, distribuição, comercialização e preparo para consumo. Um desafio adicional é a falta de conhecimento dos conceitos básicos de uma avaliação de risco, fato que se explica pela novidade do tema para o país.

3. Micro-organismos de relevância na carne bovina

Os sistemas de controle de qualidade utilizados na produção de carne bovina levam em consideração diferentes parâmetros microbiológicos, a fim de verificar a qualidade e inocuidade final dos produtos obtidos. A Comunidade Européia, por exemplo, determina a enumeração de aeróbios mesófilos e enterobactérias, além de pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças bovinas, como medidas de verificação da qualidade microbiológica do processo de abate (COMMISSION REGULATION - EC, 2007).

A inocuidade e a qualidade de produtos cárneos podem ser estimadas através da pesquisa de diversos micro-organismos indicadores, como os aeróbios mesófilos e coliformes. Coliformes, representados principalmente *Escherichia coli*, geralmente são associados à contaminação por matéria fecal e sugerem a presença de patógenos de origem entérica (JAY et al., 2005). Segundo a legislação americana, a pesquisa de *E. coli* em carcaças bovinas é obrigatória a fim de se controlar a contaminação por patógenos (USDA, 1996).

Apesar de alguns micro-organismos indicadores sugerirem a presença de certos perigos microbiológicos, a pesquisa efetiva de patógenos é fundamental para a garantia da segurança de produtos cárneos. Assim, micro-organismos frequentemente associados à carne bovina devem ser pesquisados e controlados na linha de abate e processamento.

Com relação aos produtos cárneos há consenso internacional que os patógenos de maior relevância são *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (ICMSF, 2005; COSTA, 2010; SOFOS; GEORNARAS, 2010). Inúmeras pesquisas são realizadas a fim de investigar a presença desses micro-organismos em carcaças durante o abate, cortes finais e derivados cárneos (MENGESHA et al., 2009; MORAN; SCATES; MADDEN, 2009; PRATA, 2009; FERRONATO, 2010; SOFOS; GEORNARAS, 2010; MARTINS; GERMANO, 2011; OSAILI; ALABOUDI; NESIAR, 2011; PRENDERGAST et al., 2011).

3.1 *Listeria* spp.

3.1.1 Classificação

Ao considerar o gênero *Listeria*, seis espécies eram amplamente conhecidas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. weishimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi* (TORRES et al., 2005; ROCOURT; BUCHRIESER, 2007). Contudo, estudos recentes apontaram a existência de duas novas espécies, *L. rocourtiae* e *L. marthii* (LECLERCQ et al., 2009; GRAVES et al., 2010). Entre as espécies de *Listeria*, apenas duas são reconhecidamente patogênicas: *L. monocytogenes*, que pode infectar uma variedade de espécies animais (incluindo o homem) e *L. ivanovii*, com patogenicidade restrita a outros mamíferos (BUCHRIESER, 2007). *L. seeligeri* é avirulenta e as demais espécies são consideradas saprófitas (GOPAL et al., 2010).

Ainda que *Listeria innocua* seja considerada uma bactéria não-patogênica, sua presença não deve ser subestimada, haja vista que a presença de qualquer espécie de *Listeria* nos alimentos e superfícies envolvidas em seu processamento, é uma indicação da possível presença de *L. monocytogenes* (BARBALHO, 2002; KASNOWSKI, 2004). Outro fato que merece destaque é que em 2003, na França, foi relatada a morte de uma idosa de 62 anos de idade devido a complicações ocasionadas por bacteremia por *L. innocua* (PERRIN; BEMER; DELAMARE, 2003), denotando uma situação de alerta em relação a essa espécie considerada não-patogênica.

As cepas de *L. monocytogenes* são sorotipadas de acordo com a variedade de seus antígenos somático e flagelar. Dos 13 sorotipos conhecidos, três (1/2a, 1/2b e 4b) têm sido relacionados a 90% dos surtos e casos esporádicos de listeriose (CABRITA et al., 2004), sendo as cepas do sorotipo 4b mais comumente isoladas em surtos (VASILEV et al., 2009), e cepas dos sorotipos 1/2a e 1/2b em casos esporádicos (LIANOU et al., 2006).

O patógeno se classifica ainda, em 4 linhagens evolutivas (I, II, III e IV) (ORSI; BAKKER; WIEDMANN, 2011), sendo as linhagens I e II, frequentemente associadas a cepas isoladas de alimentos e ambientes de processamento (LOMONACO et al., 2009; MELONI et al., 2009; CHEN et al., 2010). Cepas da linhagem III raramente têm sido isoladas de alimentos (SAUDERS et al., 2009). Estudos demonstraram ainda, que a Linhagem I é composta pelos sorotipos 1/2a, 3a 1/2c e 3c, a Linhagem

II por 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e e 7 e a linhagem III pelos sorotipos 4a e 4c (DOUMITH et al. 2004; NIGHTINGALE; WINDHAM; WIEDMANN, 2005).

3.1.2 Características

Listeria spp. são bactérias gram positivas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, que possuem notável habilidade de se multiplicar e sobreviver em ambientes diversos. São intracelulares facultativas, que podem invadir e replicar-se em macrófagos e células epiteliais (DUSSURGET; PIZZARO-CERDA; COSSART, 2004).

Os micro-organismos que pertencem a esse gênero, apresentam flagelos peritriquios, responsáveis pelos movimentos celulares rotatórios ou de tombamento, exibindo turvação característica na forma de guarda-chuva quando incubados a 20-25°C em ágar semi-sólido, sendo imóveis à 37°C (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008). *Listeria* spp. sobrevive em uma ampla faixa de pH (4,3 a 9,4) e em alimentos com atividade de água relativamente baixa (BELL; KYRIAKIDES, 2005; CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008).). Outro fator relevante à sua sobrevivência é a capacidade de adaptação a ambientes com altas concentrações de NaCl (até 20%) e bile (10 a 40%) (JAY, 2005).

A temperatura ótima para o crescimento desses micro-organismos oscila entre 30 e 37°C (AUTIO et al., 2003), embora seu desenvolvimento possa ocorrer em temperaturas que variam entre -0,4 e 45°C (BELL; KYRIAKIDES, 2005). Esta é uma característica particular de *Listeria* spp., no que se refere à manipulação de alimentos, pois pode se multiplicar em temperaturas de refrigeração (4°C a 10°C), normalmente utilizadas para o controle de patógenos em alimentos (BORTOLUSSI, 2008).

Dentre as espécies de *Listeria*, *L. monocytogenes* merece destaque por suas características peculiares e por ser patogênica para humanos. Além de resistir a muitas etapas de processamento na indústria de alimentos, *L. monocytogenes* possui a capacidade de colonizar superfícies com consequente formação de biofilmes (ADRIÃO et al., 2008), podendo tornar-se endêmica em plantas de processamento. A formação de biofilme gera problemas à indústria alimentícia uma vez que eles mostram maior resistência frente ao uso de sanitizantes, dificultando os processos de higienização (SOFOS, 2009), e representando, portanto, uma fonte

potencial de contaminações (DI BONAVENTURA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

As características bioquímicas e fenotípicas das bactérias do gênero *Listeria* podem ser observadas analisando a tab. 1, a qual foi adaptada de Holt et al. (1994).

Tabela 1- Características fenotípicas e bioquímicas utilizadas na discriminação de *Listeria* spp.

Testes	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>
Catalase	+	+	+	+	+
Motilidade	+	+	+	+	
β-hemólise	+	+	+	-	-
Fermentação:					
Dextrose	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-
Xilose	-	+	+	-	+
Ramnose	+	-	-	V	V

V = Variável

- = Negativo

+ = Positivo

3.1.3 *Listeria monocytogenes* e listeriose

Entre os mais importantes micro-organismos causadores de infecções alimentares, destaca-se *L. monocytogenes* a qual é o agente etiológico da listeriose, doença grave que possui elevada taxa de letalidade (entre 20% - 30%) (MANTILLA et al., 2007). Devido a esse alto índice, a listeriose encontra-se em segundo lugar no ranking das causas mais frequentes de morte por consumo de alimentos contaminados (VAILLANT et al., 2005).

Antes dos anos 80, a listeriose era uma enfermidade associada exclusivamente a animais, provocando abortos e encefalite em ovinos e bovinos. No entanto, evidências indicam que a listeriose veterinária era, na verdade, uma doença de origem alimentar, devido ao consumo de silagem contaminada, com posterior

disseminação do agente através das fezes e material proveniente de aborto. Como consequência, a bactéria distribuiu-se no ambiente, tornou-se hábil em sobreviver por longos períodos sob condições adversas e de se desenvolver a baixas temperaturas (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 2004).

Segundo dados disponíveis pelo CDC (2010), *L. monocytogenes* provoca em média, 2.500 casos de listeriose por ano nos Estados Unidos, afetando normalmente, indivíduos suscetíveis como mulheres grávidas, recém-nascidos e indivíduos com o sistema imunológico debilitado, incluindo idosos (MEAD et al., 1999; COSSART; TOLEDO-ARANA, 2008; JIANG et al., 2008). Curiosamente, na Europa, a incidência de listeriose parece ter aumentado desde 2000, sendo indivíduos com mais de 65 anos os maiores envolvidos em casos da doença (ALLERBERGER; WAGNER, 2010).

Devido à alta letalidade, a listeriose está entre as mais frequentes causas de óbito por DTA nos países da União Européia (JEMMI; STEPHAN, 2006), sendo que recentemente, a incidência de casos esporádicos ressurgiu na Europa (CAIRNS; PAYNE, 2009; KVISTHOLM et al., 2010). Na França a incidência passou de 3,5 casos por milhão de pessoas no período de 2001 a 2005, para 4,6 casos por milhão em 2006 e 5,6 casos por milhão em 2007 (GOULET et al., 2008).

Esta doença é responsável por infecções oportunistas, infectando, preferencialmente, mulheres grávidas, recém-nascidos e indivíduos com o sistema imunológico debilitado, incluindo idosos (COSSART; TOLEDO-ARANA, 2008; JALALI; ABEDI, 2008). Segundo PAINTER e SLUTSKER (2007), indivíduos saudáveis são altamente resistentes à infecção por *L. monocytogenes*, porém, podem apresentar sintomas como febre, diarreia, sonolência e fadiga.

O consumo de alimentos contaminados é a principal rota de infecção por *L. monocytogenes* para humanos (RAMASWAMY et al., 2007). Contudo, ela pode ser transmitida ainda, pelo contato direto com animais infectados, sendo essa via de transmissão, considerada rara. Outra forma de transmissão é através da contaminação cruzada durante o período neonatal (COLODNER et al., 2003).

Os alimentos mais frequentemente implicados em surtos ou casos de listeriose são leite e derivados, pescados, produtos prontos para o consumo, vegetais, carnes e derivados. No Brasil ainda não existem relatos de surtos de listeriose humana associada ao consumo de alimentos contaminados (CRUZ et al., 2008), no entanto, *L. monocytogenes* tem sido isolada de uma ampla variedade de

alimentos (CHIARINI, 2007; NALÉRIO et al., 2009; VON LAER et al., 2009; MARTINS; GERMANO, 2011). Segundo Germano e Germano (2008), isso pode estar relacionado com a subnotificação de DTA ou a dificuldade encontrada no diagnóstico, decorrentes do extenso período de incubação da doença (até 90 dias).

3.1.4 Habitat e transmissão

As bactérias pertencentes ao gênero *Listeria* possuem a característica de serem muito difundidas na natureza podendo ser isoladas do solo, água, vegetais em decomposição e em alguns casos, como integrante da microbiota fecal de muitos mamíferos, incluindo humanos adultos saudáveis (ABRAM et al., 2008).

Os animais podem carrear *L. monocytogenes* assintomaticamente e, assim, disseminá-la para os alimentos de origem animal, tais como carne e leite (CDC, 2005). Entre os animais de produção, provavelmente os ruminantes sejam a chave para a manutenção de *Listeria* spp. no ambiente rural, através de um contínuo ciclo fecal-oral (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001).

O solo, adubado com fezes de animais, também representa elevado risco de disseminação de *L. monocytogenes* para a cadeia alimentar. Como exemplo pode-se citar o primeiro surto de listeriose humana veiculado por alimentos, o qual foi desencadeado através do consumo de *coleslaw* (produto fermentado de repolho) contaminado por *L. monocytogenes*. A plantação de repolhos em questão tinha sido adubada com fezes de ovinos com histórico da doença (IVANEK; GROHN; WIEDMANN, 2006).

A silagem utilizada na alimentação de bovinos, pode ser uma fonte potencial de *L. monocytogenes* (KALAC, 2011), a qual pode contaminar consequentemente, o leite secretado pelos animais. Conforme relatado por Mohammed et al. (2009), a prevalência desse micro-organismo nas silagens em fazendas de Nova York, foi de 30%. Em pesquisa conduzida por Schocken-Iturrino et al. (2005) no Brasil, a presença de *Listeria* spp. foi observada em 65,6% das amostras de silagem no momento da abertura dos silos e, destas, 10% foram positivas para *L. monocytogenes*.

A contaminação de alimentos pelo patógeno é de difícil controle, tendo em vista sua ubiquidade e suas características fisiológicas, as quais permitem seu desenvolvimento sob condições usualmente desfavoráveis para outras bactérias

patogênicas (UHITIL et al., 2004). De acordo com Ivanek, Grohn e Wiedmann (2006), a ecologia e a transmissão de *L. monocytogenes* é muito complexa, desse modo, o conceito de prevenção da infecção nos diversos hospedeiros, inclusive no homem, está mudando. Esses autores sugerem um modelo de transmissão desse micro-organismo entre hospedeiros e habitats, o qual pode ser visualizado na Fig. 2.

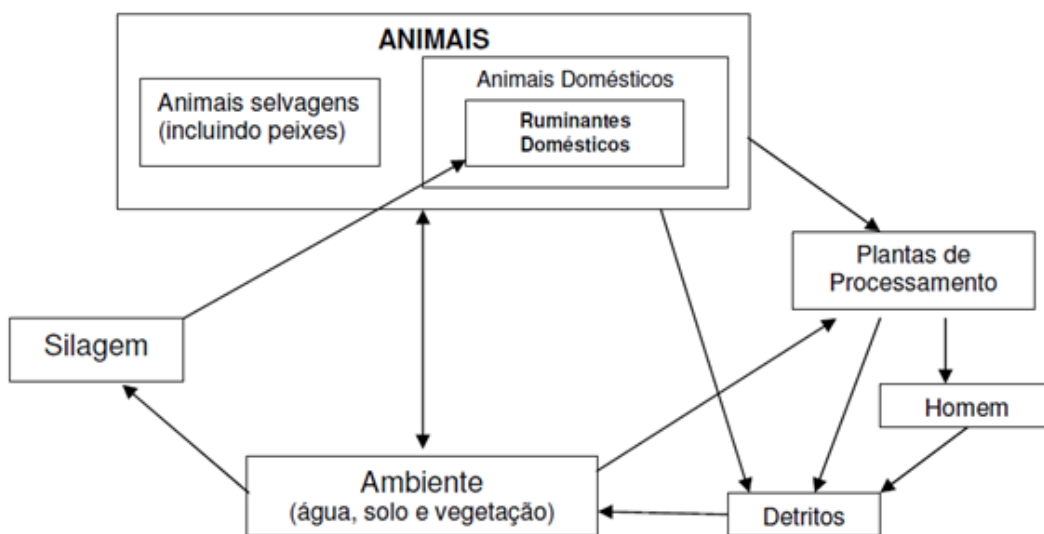


Figura 2 – Representação esquemática da transmissão de *L. monocytogenes* entre habitat e hospedeiros

Fonte: Ivanek, Grohn & Wiedmann (2006)

3.2 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* pertence a Família *Enterobacteriaceae* e é encontrado como parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. Compreende as espécies *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hemanii* e *E. vulneris* (HOLT et al., 1994) sendo *E. coli*, a espécie de maior importância em microbiologia de alimentos (BOPP et al., 2003).

E. coli são bacilos de 1,1 – 1,5 µm x 2,0 – 6,0 µm, anaeróbios facultativos, cuja temperatura ideal para desenvolvimento é de 37°C. Podem apresentar motilidade através de flagelos peritríquios, são capazes de metabolizar glicose e outros carboidratos com formação de ácido e gás, tanto em aerobiose como em anaerobiose; não produzem oxidase, mas produzem catalase (HOLT et al., 1994).

E. coli é o mais importante componente da microbiota intestinal de humanos e outros mamíferos, exercendo papel importante na manutenção da sua fisiologia (BELL, 2002). Há uma grande diversidade de cepas de *E. coli* comensais, que são constantemente excretadas no ambiente, podendo contaminar alimentos de origem animal ou vegetal, assim como superfícies e águas de recreação, geralmente sem nenhum efeito adverso à saúde humana (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000). Contudo, sua presença requer atenção especial, pois denota condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000).

Entretanto, há certos sub-grupos de *E. coli* que apresentam fatores de virulência que os tornam capazes de causar doenças intestinais e extra-intestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Isso se deve ao fato do genoma de *E. coli* ser extremamente flexível, isto é, ele perde e ganha genes de virulência com relativa frequência. Essa flexibilidade deve-se ao fato de a maioria dos genes de virulência em *E. coli* estarem localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, bacteriófagos e ilhas genômicas (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000). Sendo assim, *E. coli* pode tornar-se um patógeno através da aquisição de fatores de virulência contidos nestes elementos genéticos (COOMBES et al., 2008).

Algumas cepas de *E. coli* são consideradas patógenos primários já que adquiriram genes de virulência, principalmente para produção de toxinas, fatores de invasão e de colonização (HOLT et al., 1994), os quais conferem maior habilidade de adaptação a novos nichos, possibilitando o desenvolvimento de diversas doenças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As cepas de *E. coli* consideradas como patógenos entéricos são encontradas em perfeita simbiose com cepas comensais (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000), e podem ser divididas em categorias de acordo com os mecanismos de virulência específicos, tipo de interação que estas cepas apresentam com linhagens celulares, síndromes clínicas que desencadeiam e sorotipos.

Com base nessas características, as *E. coli* podem ser divididas nos seguintes grupos enteropatogênicos, também chamados patotipos: *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC); *E. coli* enteropatogênicas (EPEC); *E. coli* enteroagregativas (EAaggEC); *E. coli* enteroinvasivas (EIEC); *E. coli* difusamente aderentes (DAEC) e *E. coli* verotoxigênicas, também chamadas de *E. coli* produtoras de toxina de Shiga (VTEC ou STEC) (NATARO; KAPER, 1998; KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; CAPRIOLI et al., 2005).

3.2.1 *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC)

As STEC são reconhecidas como um importante grupo de patógenos emergentes e tornam-se um grande desafio à saúde pública, por causarem doenças severas transmitidas por alimentos contaminados (RANGEL et al., 2005; PIGATTO, 2008; GARVEY et al., 2009; SÁNCHEZ et al., 2010b).

A origem mais comum das infecções por STEC é o consumo de água ou de alimentos crus ou mal cozidos contaminados com esse patógeno. As infecções podem também resultar do contato direto com animais e/ou suas fezes e do contato humano-humano (KAUFMANN et al., 2006; STRACHAN et al., 2006). Uma variedade de alimentos pode estar envolvida como fonte de infecção por STEC, podendo-se citar hortaliças, frutas, salames, queijos e leite cru, entre outros (GYLES, 2007; KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010), mas a carne bovina tem sido considerada a principal fonte dessa bactéria em casos de doenças em humanos (PERELLE et al., 2007; KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010).

Esses micro-organismos têm como reservatórios, diversos animais de sangue quente, entre eles bovinos, ovinos, coelhos e macacos, com destaque para os ruminantes (YILMAZ et al., 2006; ORDEN et al., 2008; SANCHEZ et al., 2009). Porém, já foram isoladas em javalis (SANCHEZ et al., 2010b), cavalos, cães, gatos (GUN et al., 2003), cervos, moscas e aves (KAUFMANN et al., 2006).

Por definição, as STEC compreendem as cepas de *E. coli* que produzem toxinas citopáticas, semelhantes aquelas identificadas pela primeira vez em *Shigella dysenteriae* e por isso, chamadas de toxinas de Shiga (Stx) (MANNING et al., 2007). Elas são também conhecidas como verotoxinas (VT) devido ao efeito citopático irreversível que o sobrenadante da cultura destes micro-organismos causam em culturas de células Vero (KARMALI, 1989).

As STEC constituem um grupo bioquímica e sorologicamente heterogêneo (DE TONI et al., 2004) que inclui as *E. coli* entero-hemorrágicas (EHEC). O subgrupo EHEC compreende todas as cepas de *E. coli* que além de produzirem as toxinas de Shiga (Stx1 e/ou Stx2), também possuem a ilha de patogenicidade LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), responsável pela lesão do tipo A/E (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; LUCK et al., 2005; MAINIL; DAUBE, 2005).

Como consequência, as bactérias desse sub-grupo são responsáveis por severos casos de diarreia hemorrágica e falência renal, ocasionando a Síndrome Urêmica Hemolítica em humanos, podendo levar o indivíduo à morte (MAINIL; DAUBE, 2005). Surtos e casos esporádicos de doenças veiculadas por alimentos e causadas por STEC podem ocorrer mesmo pela ingestão de baixas concentrações microbianas (<100 células) (CAPRIOLI et al., 2005; VANSELOW; KRAUSE; McSWEENEY, 2005; KAUFMANN et al., 2006).

As STEC são classificadas sorologicamente em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica: antígenos O ou somáticos para os sorogrupos, e antígenos flagelares ou H para os sorotipos. Ela pode, ainda, expressar antígenos K ou capsulares, importantes na patogênese (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

Muitos sorogrupos de *E. coli* possuem potencial para produzir as shiga toxinas, destacando-se O45, O26, O91, O103, O111, O121, O145 e O157 (MANNING et al., 2007; PRADEL et al., 2008). Embora o sorotipo O157:H7 seja considerado o mais importante e mais estudado, a ocorrência de infecções causadas por outras STEC não-O157 tem aumentado em muitos países (BETTELHEIM; BEUTIN, 2003).

3.2.1.1 *Escherichia coli* O157:H7

Por definição, o sorotipo O157:H7 difere das demais cepas de *E. coli* por se multiplicar pouco ou não se multiplicar a 44°C, sendo sua temperatura ótima de 41,5°C, geralmente não fermentar o sorbitol em 24h e por não produzir β -glucuronidase (MENG; FENG; DOYLE, 2001).

Esse patógeno é considerado o modelo de STEC (TUTENEL et al., 2003) e foi isolado pela primeira vez em 1975 de uma mulher na Califórnia (EUA). Contudo só foi reconhecido como importante patógeno humano capaz de causar doenças de origem alimentar a partir de 1982, quando houve o primeiro relato de surto nos Estados Unidos (RILEY et al., 1983). Desde então, vários surtos e casos esporádicos de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (SUH) têm sido reportados mundialmente, causados pela ingestão de alimentos contaminados com este micro-organismo (RANGEL et al., 2005; CHILDS et al., 2006; ERICKSON; DOYLE, 2007; GARVEY et al., 2009).

Os bovinos, considerados reservatórios primários tanto de O157 como dos demais sorogrupos de STEC, podem carrear o micro-organismo sem demonstrar sintomatologia (RIGOBELLO et al., 2006), podendo eliminar até 10^6 UFC.g⁻¹ de *E. coli* O157:H7 nas fezes (ARTHUR et al., 2007) contaminando o couro dos animais, principalmente em situações de alta densidade, tais como o transporte ou o ambiente de confinamento (ARTHUR et al., 2007). Aliado a isso, esse micro-organismo pode sobreviver longos períodos no ambiente de criação de bovinos, como o piso de cimento de baias ou em pastagens (MAURER; LAZIZZERA; MADEC, 2008), e no ambiente de abate, em superfícies de aço inoxidável ou plástico. Desta forma, pode ocorrer contaminação cruzada de carcaças e cortes, via equipamentos e utensílios utilizados durante o corte, resfriamento, estocagem e distribuição (ERICKSON; DOYLE, 2007).

Em decorrência disso, inúmeros estudos de monitorização e vigilância têm sido realizados tanto em fazendas (PAIBA et al., 2003), como em abatedouros (CARNEY et al., 2006; ARTHUR et al., 2007; LENAHAN et al., 2007; MILNES et al., 2008; BOSILEVAC et al., 2009) com o objetivo de tentar estabelecer a prevalência e os níveis de contaminação dos animais de produção, por *E. coli* O157:H7.

Aliado a isso, considerando a importância que a carne apresenta na alimentação humana, associada à necessidade de oferecer um alimento inócuo e incapaz de veicular doenças, a investigação e caracterização de *E. coli* O157:H7 em carnes e derivados cárneos, também é expressiva (ABONGO; MOMBA, 2009; PRATA, 2009; CADIRCI et al., 2010; COSTA, 2010; ETCHEVERRÍA et al., 2010; SASAKI et al., 2010; PRENDERGAST et al., 2011).

3.2.1.1.1 Fatores de Virulência

As toxinas de Shiga são os fatores de virulência primários de STEC (COOMBES et al., 2008; MAURER; LAZIZZERA; MADEC, 2008). Porém, é importante ressaltar que apesar da grande importância de Stx como fator de virulência, e por isso as STEC serem consideradas potenciais patógenos para os humanos, nem todas as cepas produtoras de Stx são capazes de causar doenças, pois a patogenicidade é multifatorial (PETERSON et al., 2007; COOMBES et al., 2008).

São reconhecidos até o momento dois grupos de toxina de Shiga denominados Stx1 e Stx2, os quais são antigenicamente distintos e codificados por genes diferentes (*stx1* e *stx2*), mas apresentam a mesma estrutura molecular e atividade biológica (STROCKBINE et al., 1988; LAW, 2000). Estudos epidemiológicos têm revelado que Stx2 está mais associada com doenças humanas severas do que Stx1 (CAPRIOLI et al., 2005; MAINIL; DAUBE, 2005; ZAKI; EL-ADROSY, 2007).

Embora o principal fator de virulência de STEC seja a produção de um ou mais tipos de Stx, outros fatores associados à doença humana já foram descritos (GYLES, 2007) e são frequentemente utilizados para caracterizar as STEC (CAPRIOLI, et al., 2005; PIGATTO, 2008; BAI; SHI; NAGARAJA, 2010; HUNT, 2010). Entre esses fatores, estão a intimina (FRANKEL et al., 1998) e a enterohemolisina (PIÉRARD et al., 1997), as quais também relacionam-se a patogenicidade do micro-organismo.

Segundo Chahed et al. (2006) o gene *eaeA* é um importante marcador de virulência de STEC que está contido numa ilha de patogenicidade, conhecida como região LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) (JERSE, 1990). Esse gene codifica para a intimina, uma proteína de membrana externa que promove a adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal (FRANKEL et al., 2001; GARRIDO et al., 2006), caracterizando a chamada lesão A/E (*attaching and effacing*).

O gene *eaeA* aparentemente não é necessário para a virulência das cepas STEC (PATON et al., 1999), entretanto, cepas LEE-positivas estão associadas com doenças humanas mais severas, enquanto STEC LEE-negativas, raramente são isoladas de casos de diarreia sangüinolenta e SHU.

O gene que codifica a entero-hemolisina em STEC é denominado por alguns pesquisadores como *ehxA* (KAUFMANN et al., 2006; VAZ et al., 2006) e está contido em um plasmídeo de virulência de aproximadamente 60 MDa. A sequência de nucleotídeos deste plasmídeo demonstra que ele codifica 35 proteínas, algumas das quais estão provavelmente envolvidas na patogenicidade do micro-organismo (NATARO; KAPER, 1998; CAPRIOLI et al., 2005).

A participação da entero-hemolisina na virulência de cepas de STEC ainda não está elucidada (CHAHED et al., 2006; SAITON et al., 2008) mas sabe-se que essa proteína atua destruindo eritrócitos, leucócitos, células endoteliais, granulócitos, monócitos e linfócitos T humanos, através da formação de pequenos poros (MAINIL; DAUBE, 2005). Para os autores, a síntese de entero-hemolisina está associada à

produção de Stx 1 e/ou Stx 2 em isolados de STEC tanto de origem humana como animal.

Entre as características que diferem o sorotipo O157:H7 das demais linhagens de *E. coli*, destaca-se sua incapacidade de produzir β -glucuronidase (MENG; FENG; DOYLE, 2001). Portanto, a identificação do gene *uidA*, que codifica para a β -glucuronidase (FENG, 1993), pode ser utilizada para identificação do sorotipo (FENG; MONDAY, 2000).

3.3 Micro-organismos indicadores de higiene

A utilização de micro-organismos patogênicos na análise e monitoramento de possíveis pontos de contaminação, na prática, é difícil, onerosa e demorada, sendo necessária ou mais conveniente, a pesquisa de micro-organismos indicadores (ICMSF, 1997).

Indicadores de higiene são utilizados para inferir sobre o *status* microbiológico de produtos alimentícios, bem como, instalações e dependências. Por meio deles, pode-se formar juízo sobre a contaminação dos alimentos, por micro-organismos patogênicos ou toxigênicos e suas toxinas, e apurar o estado de higiene e sanidade dos produtos (EVANGELISTA, 2001).

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

As contagens de coliformes totais e *E. coli* podem estimar falhas na higiene e indicar contaminação de origem fecal, sendo que elevadas contagens destes grupos de micro-organismos podem estar relacionadas a níveis significativos de enteropatógenos, como a *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 (JAY, 2005; GILL; MCGINNIS; BADONI, 1996).

Há mais de duas décadas, métodos rápidos de análise microbiológica vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de substituir os métodos tradicionais, oferecendo resultados mais rápidos e sensíveis (PRIEGO; MEDINA; JORDANO,

2000; JASSON et al., 2010). Um dos métodos rápidos mais utilizados para detecção de coliformes totais e de *E. coli* em alimentos, é o Petrifilm EC (3M Company) que é versátil e de fácil estocagem, manuseio e descarte (FRANCO; LANDGRAF, 2005; NYACHUBA; DONNELLY, 2007; NERO et al., 2008).

Alguns países como Estados Unidos, Canadá, Austrália, Coréia, Portugal, Noruega, Itália, entre outros, desenvolveram trabalhos e estudos colaborativos para avaliar a eficiência das placas Petrifilm e de outros métodos rápidos em relação aos métodos convencionais (BEUCHAT et al., 1998; GANGAR ET AL., 1999; RUSSEL, 2000). Nesse sentido, Silva et al. (2006) verificou também, que a técnica dos tubos múltiplos apresentou resultados falso-negativos para *E. coli* ou, em algumas amostras de alimentos de origem animal, contagens estimadas inferiores ao Petrifilm EC, demonstrando que o método rápido mostrou-se sensível e eficiente para detecção de *E. coli* em alimentos.

Segundo Forsythe (2002) o sistema Petrifilm é uma alternativa mais rápida ao método de plaqueamento convencional que utiliza uma mistura desidratada de nutrientes (ágar vermelho violeta bile), agente geleificante (solúvel em água fria), indicador de atividade glucuronidásica (5-bromo-4cloro-3-indolil- β - D-glicuronideo) e um indicador tetrazólico para facilitar a enumeração das colônias sobre um filme.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Abatedouros-Frigoríficos

As amostras foram coletadas entre Abril de 2010 a Janeiro de 2011, totalizando 9 coletas, em dois estabelecimentos localizados na região sul do Rio Grande do Sul. Um deles, identificado como Frigorífico A, é um estabelecimento representativo da produção nacional que possui habilitação para exportar para a União Européia. Inspeccionado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o frigorífico A conta com um quadro de 700 funcionários e possui capacidade para abater, em média, 650 bovinos por dia.

O Frigorífico B é inspeccionado pela Coordenadoria de Inspeção de Produtos de Origem Animal (CISPOA) que consiste no órgão da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Rio Grande do Sul (SEAPA - RS) responsável pela inspeção de produtos de origem animal comercializados dentro do estado. O frigorífico opera com cerca de 140 funcionários e abate em média, 150 carcaças bovinas ao dia.

2. Processo de Amostragem

2.1 Amostragem das carcaças

A amostragem das carcaças bovinas foi realizada pela técnica de esfregaço em superfície, coletados durante o abate dos animais, em quatro pontos considerados críticos no processo, sendo eles após as etapas de sangria (Ponto 1), esfolia (Ponto 2), evisceração (Ponto 3) e lavagem pré-resfriamento (Ponto 4), conforme assinalado no fluxograma abaixo:

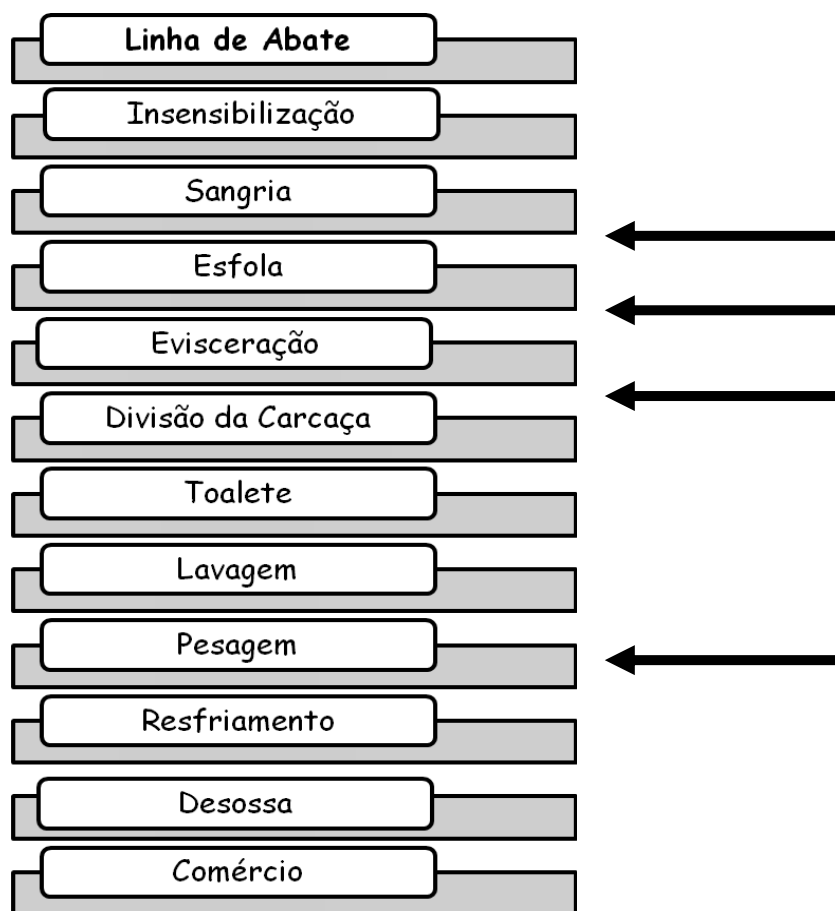


Figura 3 - Pontos de amostragem na linha de abate de bovinos

Foram amostradas 60 carcaças, das quais 22 foram coletadas no frigorífico A, e 38 no frigorífico B, perfazendo um total de 240 amostras de carcaças bovinas.

A amostragem foi realizada segundo as recomendações vigentes na Comunidade Económica Europeia (COMMISSION REGULATION - EC, 2007), utilizando-se a técnica de esfregação de superfície (Esponjas 3M™), aplicada na região do peito do animal, nas respectivas carcaças e meias-carcaças, conforme demonstrado na Fig. 4:

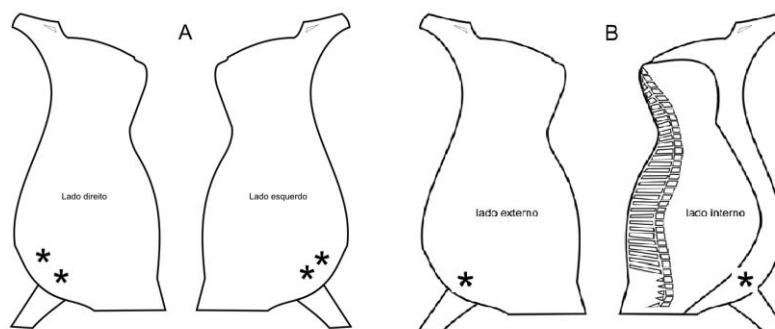


Figura 4 - Esquema representativo de carcaças bovinas antes (A) e após (B - na meia carcaça direita) divisão em duas metades carcaças, com indicação dos pontos (*) onde foram coletadas as amostras de superfície das carcaças.

Em cada ponto de coleta foram amostradas quatro áreas de 100cm², com auxílio de quatro esponjas estéreis (10cm x 10cm). Antes da divisão em duas metades carcaças (após as etapas de sangria e esfola), os quatro pontos foram amostrados na parte externa da carcaça. Após sua divisão, nas etapas de evisceração e lavagem, as metades carcaças esquerda e direita, foram amostradas na região interna e externa do peito do animal.

As esponjas obtidas em cada ponto de coleta foram acondicionados em um *bag* estéril e, sob refrigeração, conduzidos ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da FAEM/UFPEL. No laboratório, em condições estéreis, cada conjunto de esponjas foi adicionado de 200mL de solução salina peptonada (0,1%), e submetido à agitação em homogeneizador peristáltico tipo Stomacher. Três alíquotas de 40mL foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas a uma velocidade de 1000xg. Os homogenatos foram submetidos às análises microbiológicas para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene (Coliformes Totais e *E.coli*) e isolamento e identificação de *Listeria* spp. e *E.coli* O157:H7, conforme ilustrado no Apêndice A.

2.2 Amostragem do ambiente de processamento

A amostragem do ambiente de processamento foi realizada somente no Frigorífico B, onde foram avaliadas 40 amostras, conforme indica a tab. 2. As amostras foram coletadas em três pontos distintos: mesas, facas e mãos dos manipuladores (antes do início do processo e durante a execução dos cortes). Além desses pontos, durante o abate dos animais, avaliou-se a contaminação presente na

serra utilizada para abertura do esterno, antes da etapa de evisceração e na serra empregada para divisão total das meias carcaças, após a etapa de remoção das vísceras, sendo identificadas respectivamente, como Serra A e Serra B.

Tabela 2 - Amostras coletadas no ambiente de processamento no Frigorífico B

Período das atividades	Ponto amostrado	Nº de amostras
Antes processamento	Faca	5
Durante processamento	Faca	5
Antes processamento	Mesa	5
Durante processamento	Mesa	5
Antes processamento	Mãos dos manipuladores	5
Durante processamento	Mãos dos manipuladores	5
Durante o abate	Serra A	5
Durante o abate	Serra B	5
		40

As superfícies das mesas, facas e serras foram amostradas utilizando-se *swab* de algodão esterilizado, perfazendo uma superfície total de 25cm², segundo recomendações vigentes na Comunidade Européia (COMMISSION REGULATION - CE, 2007) com modificações. Após amostragem, os *swabs* foram acondicionados em tubos contendo *Half Fraser* (Oxoid®), TSB suplementado com Novobiocina SR0181A (Oxoid®) e Água Peptonada Salina (Oxoid®), para posterior análise de *Listeria* spp., *E. coli* O157H:7 e micro-organismos indicadores de higiene, respectivamente.

As mãos dos manipuladores foram amostradas pela técnica da lavagem superficial com 200mL de água salina (0,85%) peptonada (0,1%) (Oxoid®). Os frascos estéreis contendo a água de lavagem foram conduzidos sob refrigeração, ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos. No laboratório, três alíquotas de 40mL foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas a uma velocidade de 1000xg. Os homogenatos obtidos foram submetidos às análises microbiológicas de enumeração de micro-organismos indicadores de higiene (Coliformes Totais e *E. coli*) e isolamento e identificação de *Listeria* spp. e *E. coli* O157:H7.

2.3 Amostragem dos cortes cárneos (Filé mignon e Alcatra)

Foram amostrados 12 cortes cárneos embalados á vácuo, os quais correspondiam a seis cortes de filé mignon e seis de alcatra. As amostras dos cortes foram adquiridas no Frigorífico B, em sua embalagem original, acondicionadas em caixas isotérmicas e conduzidas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPel.

No laboratório, foi realizada a amostragem dos cortes através da técnica de esfregação de superfície (Esponjas 3M™), de acordo com recomendações vigentes na Comunidade Européia (COMMISSION REGULATION - EC, 2007).

As peças foram amostradas em quatro pontos distintos com auxílio de esponjas e moldes de 100cm² (10cm x 10cm) estéreis. O conjunto de esponjas referente a amostragem de cada corte, foi suspenso em 200mL de Solução Salina Peptonada (0,1%), e agitado em homogeneizador peristáltico tipo Stomacher. Três alíquotas de 40mL foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas a uma velocidade de 1000xg. Os homogenatos obtidos foram submetidos às análises microbiológicas para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene (Coliformes Totais e *E. coli*) e isolamento e identificação de *Listeria* spp. e *E. coli* O157:H7.

3. Análises microbiológicas

3.1 Isolamento e identificação de bactérias do gênero *Listeria*

Após centrifugação, os homogenatos obtidos e as amostras de *swab*, foram submetidos à análise de *Listeria* spp. conforme a metodologia preconizada pelo International Organization for Standardization (ISO 11.290-1), com modificações (Apêndice C).

Enriquecimento seletivo

Os sedimentos obtidos da centrifugação das amostras das carcaças e da água de lavagem das mãos e dos cortes, foram ressuspensos em 10mL de *Half Fraser* adicionado do suplemento SR0166E (Oxoid®) e incubados a 30°C durante 24h. As amostras de *swab*, que haviam sido inoculadas diretamente em *Half Fraser* (Oxoid®), foram imediatamente incubadas em estufa após chegarem ao laboratório.

Enriquecimento seletivo diferencial

A partir das amostras previamente enriquecidas em *Half Fraser* (Oxoid®), retirou-se uma alíquota de 0,1mL, inoculou-se em caldo Fraser (Oxoid®) adicionado do suplemento SR 0140E (Oxoid®) e incubou-se a 35-37°C por 48h.

Plaqueamento seletivo diferencial

Após o período de incubação, as amostras foram semeadas em ágares seletivos e diferenciais: ágar Oxford (Oxoid®) adicionado do suplemento SR0140E (Oxoid®) e Ágar Cromogênio (Oxoid®) adicionado dos suplementos SR 0226E e SR0228E (Oxoid®). As placas foram incubadas a 35°C por 48h.

Seleção e cultivo de colônias

A partir de cada um dos meios de cultura seletivos, foram selecionadas 3 colônias características de *Listeria* spp., as quais foram repicadas para Ágar Triptona de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE,) (Oxoid®), e incubadas por 35°C durante 24h.

Identificação fenotípica de *Listeria* spp.

Para a identificação fenotípica em nível de espécie, foram empregados os testes de produção de catalase, motilidade a 25°C em ágar semi-sólido, β - hemólise em ágar sangue de cavalo desfibrinado e fermentação de carboidratos (ramnose, dextrose, manitol e xilose), segundo tab. 1.

Teste da catalase: em uma lâmina de vidro previamente higienizada com álcool etílico, produziu-se uma suspensão bacteriana (cultivo e água salina 0,85% estéril) e adicionou-se água oxigenada a 3%. A reação positiva para o teste, ou seja, a presença da enzima, é evidenciada pelo aparecimento de bolhas de oxigênio.

Motilidade: foi avaliada a partir da inoculação dos isolados, com o auxílio de agulhas descartáveis, em 4mL de ágar Motilidade (Motility Test Medium, Difco®), os quais foram incubados a 25°C por até 7 dias. Durante esse período, realizou-se monitoramento diário, a fim de detectar a motilidade característica de *Listeria* spp., a qual se apresenta em formato de guarda-chuva, demonstrando a propriedade microaerofílica dessa bactéria.

Teste de β -hemólise: foi realizado em placas de petri contendo ágar Sangue de Cavalo (7%) desfibrinado, as quais foram divididas em 20 espaços, onde cada isolado foi inoculado com a utilização de agulhas descartáveis, e incubadas a 35°C durante 24-48h. Finalizado o período de incubação, as placas foram observadas sob luz clara, a fim de detectar produção de hemolisina. O resultado para cada isolado foi registrado como β -hemolítico (presença de zona de clareamento total ao redor do inóculo) ou como não β -hemolítico (sem produção de zona de clareamento ao redor do inóculo).

Fermentação de carboidratos: foi efetuada com a adição dos respectivos açúcares [xilose (Vetec[®]), dextrose (Reagen[®]), manitol (Vetec[®]) e ramnose (Vetec[®])] isoladamente, em ágar Púrpura de Bromocresol (Difco[®]), o qual é o agente indicador de pH na reação de fermentação. As placas de petri, utilizadas para avaliar a fermentação de cada carboidrato, foram divididas em 20 espaços para posterior inoculação dos isolados e incubação a 35-37°C, por 24h. Os isolados foram considerados positivos para fermentação de cada carboidrato se, ao redor do local da inoculação, havia a produção de um halo amarelo, devido à degradação do açúcar e consequente produção de ácido e alteração do pH do meio. Os resultados negativos eram aqueles em que não havia mudança da coloração do ágar no local da inoculação,

3.2 Detecção de *E. coli* O157:H7

Após centrifugação, os homogenatos obtidos e as amostras de *swab*, foram submetidos à análise de *E. coli* O157:H7 segundo método preconizado pelo International Organization for Standardization (ISO 16654), com modificações (Apêndice D).

Enriquecimento

O sedimento obtido da centrifugação das amostras das carcaças, água de lavagem das mãos e cortes, foram ressuspensos em 10mL de caldo Triptona Soja modificada contendo novobiocina SR0181A (mTSB + N) (Oxoid[®]), com incubação a 41,5°C por 18-24h. As amostras de *swab*, que haviam sido inoculadas diretamente no mTSB + N, foram imediatamente incubadas ao chegarem ao laboratório.

Separação e Concentração microbiana

A concentração e separação dos micro-organismos foram realizadas utilizando-se a técnica de separação imunomagnética (IMS), empregando-se partículas imunomagnetizadas recobertas com anticorpos anti-O157 (Invitrogen®), seguindo recomendações do fabricante.

Isolamento

Para isolamento foram utilizados os ágaros MacConkey Sorbitol (Oxoid®), e MacConkey Sorbitol suplementado com Telurito-cefixima SR0172E (CT-SMAC) (Oxoid®). As placas inoculadas foram incubadas a 35°C por 24h. A partir de cada um dos meios de cultura seletivos, foram selecionadas três colônias sorbitol negativas, características de *E. coli* O157, as quais apresentam-se incolores no ágar MacConkey Sorbitol (Oxoid®). As colônias foram repicadas para ágar Triptona de Soja (TSA) (Oxoid®), e incubadas por 35°C durante 24h.

Identificação bioquímica de *E. coli* O157

A confirmação bioquímica de *E. coli* foi realizada através da série EPM-Mili-Citrato (Enterokit B) proposto por Toledo et. al. (1982a), a qual reúne oito testes bioquímicos, que somados ao da fermentação da lactose na placa de isolamento, simplificam consideravelmente a identificação de bactérias Toledo et. al. (1982b).

Com uma agulha descartável, inocularam-se os três meios na seguinte ordem: Citrato, EPM e MILI. Para inocular o meio citrato, deslizou-se a agulha de inoculação pelo centro estriando toda a superfície inclinada. No meio EPM, a agulha foi introduzida verticalmente no centro do meio, enquanto que o MILI foi semeado com picada central, que deve atingir o fundo do tubo. Os tubos foram incubados durante 24h a uma temperatura de 35°C.

Transcorrido esse período, realizou-se a leitura de motilidade, formação de indol e detecção de lisina descarboxilase no tubo contendo MILI. Para verificação da produção de indol, no momento da leitura, adicionaram-se ao meio, três a quatro gotas de reativo de Kovacs, onde a formação de um anel vermelho ou róseo na superfície indica a presença do indol, enquanto que o anel de cor amarela indica reação negativa. A motilidade foi verificada pela turvação total do meio ou pela observação de crescimento além da linha de inoculação. Quando houve

fermentação da glicose, ocorreu a troca de cor da base do meio para amarelo, e com a descarboxilação da lisina, a cor do meio foi revertida para roxo.

No tubo contendo EPM observou-se a produção de gás, H₂S e urease na base do meio, enquanto que a produção de L-triptofano desaminase foi observada na superfície. Na fermentação da glicose há acidificação do meio na base, mudando a coloração para amarelo através do indicador azul de bromotimol e, no caso de produção de gás, há formação de bolhas. Na produção de urease ocorre alcalinização do meio e a mudança do indicador para azul, amarelo ou amarelo-esverdeado. Quando há produção de H₂S, a base do meio torna-se preta. Coloração verde-escuro na superfície indica produção de L-Triptofano desaminase.

Quando o micro-organismo não utiliza o citrato como fonte de carbono, o meio citrato de Simmons (Vetec[®]) permanece com coloração esverdeada. Quando o meio adquire cor azul, o resultado é considerado positivo.

Confirmação Sorológica

As colônias sorbitol negativas caracterizadas como *E. coli* na triagem bioquímica, foram submetidas a testes sorológicos com anti-soro O157 (Probac[®]).

Procedeu-se o teste depositando sobre uma lâmina de vidro, uma gota do anti-soro e uma alçada da suspensão bacteriana. Após homogeneização durante um a dois minutos, verificou-se a formação ou não de grumos.

PCR Multiplex para identificação de fatores de virulência

Após a sorologia, os isolados que apresentaram aglutinação característica na reação com anti-soro O157, foram cultivados em tubos tipo Eppendorf contendo TSA (Oxoid[®]) e incubados por 35-37°C durante 24h. Os isolados foram encaminhados ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, para serem submetidos a identificação de fatores de virulência.

Os isolados foram submetidos a PCR Multiplex para identificação dos genes *stx1*, *stx2*, *uidA*, *eaeA* e *ehxA*, segundo protocolo proposto por Feng e Monday (2000).

Para amplificação das sequências utilizaram-se *primers* de acordo com a tab.

3.

Tabela 3 - Sequência dos *primers* utilizados para identificação dos fatores de virulência de *E. coli* O157:H7

Gene	Tamanho do produto de amplificação (pb)	Sequência 5'-3'	Primers
<i>stx1</i>	348	5'-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3'	LP30
		5'-CACCAGACAATGTAACCGCTG-3'	LP31
<i>stx2</i>	584	5'-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3'	LP43
		5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'	LP44
<i>uidA</i>	252	5'-GCGAAACTGTGGAATTGGG-3'	PT-2
		5'-TGATGCTCCATCACTTCCTG-3'	PT-3
<i>eaeA</i>	397	5'-ATTACCATCCACACAGACGGT-3'	AE22
		5'-ACAGCGTGGTTGGATCAACCT-3'	AE20
<i>ehxA</i>	158	5'-GTTTATTCTGGGGCAGGCTC-3'	MFS1Fb
		5'-CTTCACGTCACCATACATAT-3'	MFS1R

Fonte: Feng e Monday, 2000.

3.3 Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene

Os homogenatos obtidos da centrifugação das amostras das carcaças, água de lavagem das mãos e cortes, foram ressuspensos em 10mL de água peptonada salina (APS 0,1%) (Oxoid®) e submetidos à diluição seriada em escala decimal, para enumeração dos micro-organismos indicadores de higiene. As amostras de *swab*, que haviam sido inoculadas diretamente na APS 0,1% (Oxoid®), após chegarem ao laboratório foram imediatamente submetidas à diluição seriada (Apêndice B).

As populações de coliformes totais e de *E. coli* foram determinadas empregando-se placas de Petrifilm™ EC com incubação à 35°C por 24h. Transcorrido esse período, foi realizada a enumeração das colônias típicas onde as colônias vermelhas e azuis apresentando produção de gás foram contadas como coliformes totais, e as colônias azuis com produção de gás como *E. coli*. Os resultados das contagens foram expressos em log₁₀ unidades formadoras de colônia (UFC) por unidade de área (cm²) (log UFC.cm⁻²).

3.4 Análise Estatística

As médias e o desvio padrão das contagens de *E. coli* e Coliformes Totais foram realizados utilizando-se análise de variância pelo teste de Newman-Keuls. Os valores de P inferior a 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados indicativos de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Ocorrência de *Listeria* spp.

1.1 Carcaças Bovinas:

A ocorrência de *Listeria* spp. nas carcaças bovinas em ambos os Frigoríficos foi de 36,7%(22/60), sendo 30% (18/60) dos isolados, caracterizados como *L. innocua*, 3,3% (2/60) como *L. monocytogenes*, 3,3% (2/60) como *L. welshimeri* e 1,7% (1/60) identificada como *L. gray*, conforme demonstrado na Fig. 5.

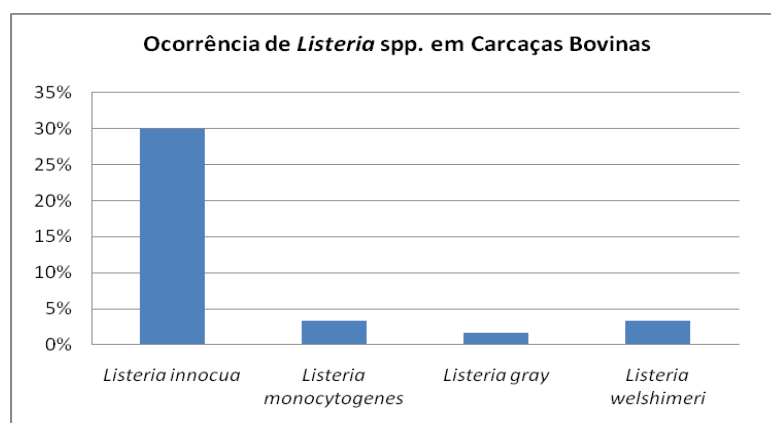


Figura 5 - Espécies de *Listeria* isoladas em carcaças bovinas avaliadas durante as etapas de abate nos Frigoríficos A e B.

Cabe ressaltar que uma das carcaças avaliadas apresentou contaminação simultânea com *L. innocua* e *L. monocytogenes*, o que pode ser observado pelos valores das ocorrências de *Listeria* spp.

Ao considerar os pontos de isolamento das espécies de *Listeria* encontradas, nota-se que *L. innocua* foi isolada com maior frequência após a etapa de sangria (Ponto 1), quando comparado com os demais pontos amostrados. Contudo, ao considerar a espécie patogênica *L. monocytogenes*, observou-se que todas as cepas foram isoladas após a etapa de lavagem pré-resfriamento. *L. welshimeri* e *L. gray* foram isoladas somente após as etapas de sangria e evisceração, respectivamente, conforme demonstra a tab. 4:

Tabela 4 - Frequência de isolamento de *Listeria* spp. após as etapas de sangria, esfolagem, evisceração e lavagem pré-resfriamento das carcaças no abate de bovinos nos Frigoríficos A e B.

Pontos amostrados	<i>Listeria</i> spp.			
	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. gray</i>
Após sangria	21,7%	0%	3,3%	0%
Após esfolagem	0 %	0%	0%	0%
Após evisceração	3,3 %	0%	0%	1,7%
Após lavagem	5,0 %	3,3%	0%	0%
TOTAL	30%	3,3%	3,3%	1,7%

Na Fig. 6 evidencia-se que considerando todas as carcaças avaliadas, *L. innocua* foi a espécie de maior prevalência nos diferentes pontos amostrados na linha de abate de bovinos, sendo que após a etapa de esfolagem, nenhuma espécie foi isolada.

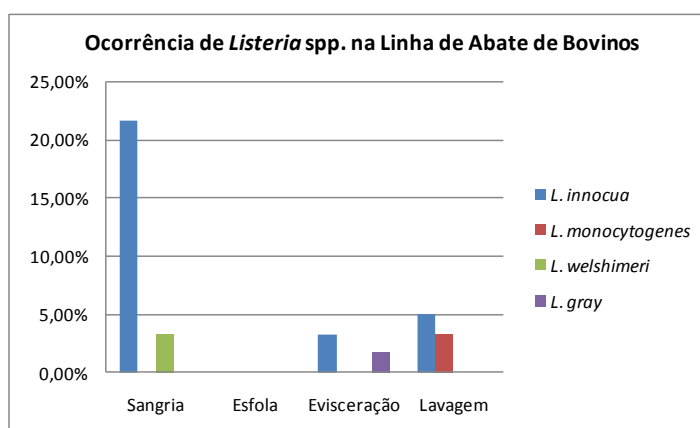


Figura 6 - Ocorrência de *Listeria* spp. após as etapas de sangria, esfolagem, evisceração e lavagem pré-resfriamento na linha de abate de bovinos, nos Frigoríficos A e B.

No frigorífico A não se isolou *L. monocytogenes* nas carcaças (22 amostras) em nenhum dos quatro pontos avaliados durante o abate. Já *L. innocua* foi isolada após a etapa de sangria (Ponto 1), em 31,8% (7/22) das carcaças, e após a

evisceração (Ponto 3) em 4,5% (1/22) dos animais abatidos. *L. gray* foi isolada em apenas uma carcaça, após a evisceração (Ponto3). Salienta-se que nas carcaças onde *Listeria* spp. foi isolada no Ponto 1, o micro-organismo não foi detectado nas etapas subsequentes. Nas amostras correspondentes as etapas de esfolagem e lavagem pré-resfriamento, a presença de *Listeria* spp. não foi verificada, como demonstra a Fig. 7.

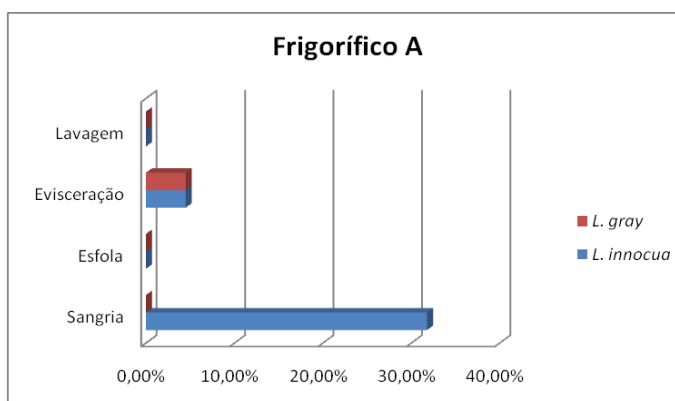


Figura 7- Ocorrência de *Listeria* spp. nas etapas de abates de bovinos abatidos no Frigorífico A

No frigorífico B, das 38 carcaças amostradas, 5,3% (2/38) apresentaram-se contaminadas por *L. monocytogenes*, todas após a etapa de lavagem pré-resfriamento (Ponto 4). *L. innocua* foi isolada em 15,8% (6/38) das carcaças na etapa de sangria (Ponto 1), em 2,6% (1/38) na etapa de evisceração (Ponto 3) e em 7,9% (3/38) das carcaças após a lavagem pré-resfriamento (Ponto 4) dos animais abatidos. *L. welshimeri* foi isolada no Ponto 1 (após a sangria) em 5,3% (2/38) das carcaças. Assim como no Frigorífico A, no estabelecimento B, nenhuma espécie de *Listeria* foi isolada imediatamente após a etapa de esfolagem das carcaças bovinas.

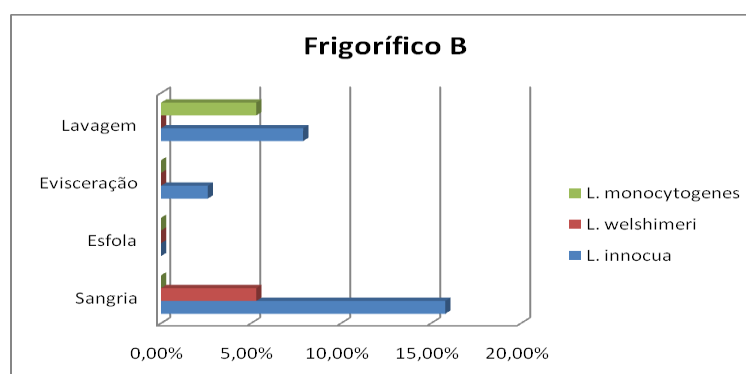


Figura 8 - Ocorrência de *Listeria* spp. nas etapas de abates de bovinos abatidos no Frigorífico B

Nas Fig. 7 e 8 pode-se observar que a ocorrência de *Listeria* spp. foi maior no ponto equivalente a etapa de sangria das carcaças. Contudo, no Frigorífico B, ainda que a ocorrência desses micro-organismos tenha sido menos expressiva no ponto correspondente a lavagem pré-resfriamento (Ponto 4) quando comparado com a etapa de sangria, destaca-se a ocorrência de *L. monocytogenes* verificada nessa etapa, já que a presença deste patógeno na carne é preocupante do ponto de vista de saúde pública.

A ocorrência de *L. innocua* frente às demais espécies de *Listeria* observada nas carcaças bovinas, está em concordância com resultados obtidos por outros autores, os quais também citam essa espécie, como a mais comumente encontrada, tanto em carcaças quanto em cortes finais de bovinos e aves (KASNOWSKI, 2004; CHIARINI, 2007; CHEN et al., 2009; CHIARINI et al., 2009; NALÉRIO et al., 2009; FERRONATTO, 2010). Por outro lado, Osaili, Alaboudi e Nesiar (2011), ao avaliar a presença de *Listeria* spp. em cortes de frango, verificaram que nenhum dos 141 isolados foi caracterizado como *L. innocua*. É importante ressaltar que, ainda que *L. innocua* seja considerada uma espécie não-patogênica, a elevada ocorrência deste micro-organismo observada neste estudo não deve ser subestimada, visto que *L. innocua* é um indicador da presença de *L. monocytogenes* por apresentarem similaridade em exigências nutricionais e ambientais, além de serem provenientes das mesmas fontes de contaminação (KASNOWSKI, 2004).

A maior ocorrência de *Listeria* spp. no Ponto 1, é justificada pela amostragem ter sido realizada no couro e este ser um carreador de fezes e demais sujidades. Contudo, apenas as espécies não-patogênicas *L. welshimeri* e *L. innocua* foram isoladas no couro. Betancourt et al. (2004) demonstraram que a ocorrência de *Listeria* spp. no couro bovino em dois Frigoríficos (denominados A e B) foi, respectivamente, de 37,7 e 75,5%, enquanto que, para *L. monocytogenes* foi, de 0,8 e 18,7%.

Considerando que a sangria dos animais é a primeira etapa invasiva na carcaça e reconhecida como importante rota de contaminação (SCHWACH, 2007), é de grande importância o controle efetivo dessa etapa. Gill (2004) observou que a lavagem dos animais antes do abate reduz consideravelmente a carga microbiana inicial presente no couro. Nesse sentido, Rhoades, Duffy e Koutsoumanis (2009) constataram que o couro dos animais está relacionado a 12% (10-13%) da

prevalência média de *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva da carne bovina, enquanto que as fezes estão associadas a 19% (4,8-29%).

Durante o abate a esfolagem possibilita a contaminação da superfície das carcaças a partir de micro-organismos presentes na pele, pêlos e cascos dos animais (GILL; LANDERS, 2004; FONTOURA, 2006). De acordo com Bosilevac et al. (2009), as taxas de contaminação das carcaças após a remoção da pele estão diretamente relacionadas com os níveis de contaminação que entram no abatedouro. Contudo, nesse estudo, tanto no Frigorífico A quanto no B, *Listeria* spp. não foi isolada nessa etapa, demonstrando que o processo de retirada do couro foi realizado de modo que os micro-organismos presentes, não foram carregados para a carcaça. A comparação desse resultado com outras pesquisas foi limitada, visto que estudos semelhantes não foram encontrados na literatura.

Verificou-se que após evisceração, a taxa de isolamento de *Listeria* spp. foi baixa nos dois estabelecimentos, sendo de 9,1% (2/38) no Frigorífico B e 4,5% (1/22) no Frigorífico A. As espécies isoladas nesse ponto de amostragem foram caracterizadas fenotipicamente como *L. innocua* e *L. gray*, ambas consideradas não-patogênicas. Ferronato (2010) avaliou a presença de *Listeria* spp. no abate de suínos, e verificou que houve prevalência de *L. monocytogenes* após a evisceração, demonstrando que essa etapa é crítica durante o abate desses animais.

A ausência de *Listeria* spp. após a esfolagem nos dois frigoríficos avaliados infere que a contaminação verificada na etapa de evisceração pode ser resultante da contaminação cruzada decorrente do contato com utensílios e equipamentos contaminados. Porém, segundo Santos (2003), a presença de *Listeria* spp. após a etapa de evisceração, indica que a carcaça pode ter sido contaminada por fezes de animais portadores sadios ou doentes durante o abate.

A ausência de *Listeria* spp. nas amostras após a lavagem pré-resfriamento, no Frigorífico A, demonstra que este processo operacional mostrou-se eficiente na redução da contaminação microbiana adquirida durante as etapas de abate. Contudo, o oposto foi observado no Frigorífico B, onde duas das 38 amostras avaliadas apresentaram-se positivas em relação à presença de *L. monocytogenes* após a lavagem das carcaças bovinas. Resultado semelhante foi observado por França (2008) que encontrou 10% de amostras positivas (3/30) para *L. monocytogenes* em meias carcaças resfriadas de bovinos.

O resultado obtido no Frigorífico B infere que a operação de lavagem não foi eficiente na remoção de patógenos, podendo ter, inclusive, redistribuído a contaminação superficial pré-existente, já que o micro-organismo não foi isolado nas etapas anteriores. Isso denota a necessidade de readequações desse processo operacional, visto que a temperatura e pressão da água de lavagem podem ter influenciado na eficiência do processo (SABA; BÜRGER; ROSSI, 2010).

Os resultados deste trabalho não estão em concordância com os obtidos por Fontoura (2006), que avaliou a superfície de 40 meias carcaças depois da etapa de lavagem, decorridas 24h de refrigeração à 0°C, e não encontrou *Listeria* spp.

1.2 Ambiente de processamento e cortes cárneos embalados a vácuo

Verificou-se a ocorrência de *Listeria* spp. em 22,5% (9/40) das amostras de ambiente avaliadas, sendo 10% delas, classificadas fenotipicamente como *L. monocytogenes* e 15% como *L. innocua*. É interessante frisar que uma das amostras de faca antes do início das atividades, apresentou contaminação simultânea com *L. innocua* e *L. monocytogenes*.

Listeria spp. não foi isolada nas mãos dos manipuladores antes de iniciarem as atividades na sala de cortes, nem nas Serras A (abertura do esterno) e B (divisão das carcaças), utilizadas durante o abate de bovinos. Contudo, nas demais amostras de ambiente, inclusive nas mãos durante o processamento dos cortes, o micro-organismo foi identificado, com destaque para as amostras de mesa e faca antes do início das atividades, e mesa durante as operações de corte, nas quais foram identificadas duas espécies de *Listeria*, conforme indicado na Fig. 9:

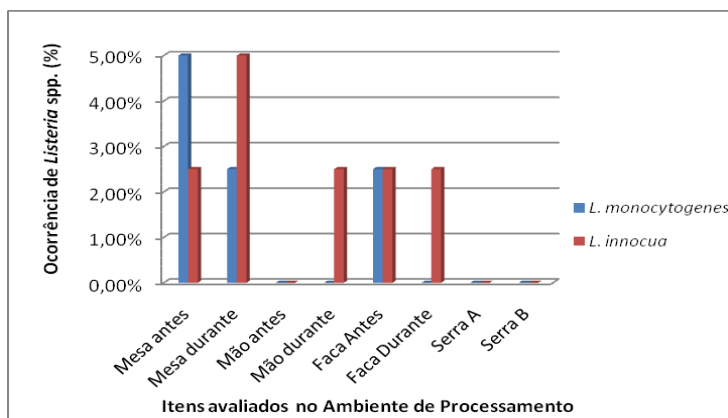


Figura 9 - Ocorrência de *Listeria* spp. no ambiente de processamento de cortes amostrados no Frigorífico B.

Ao analisar os cortes finais embalados a vácuo, foi verificada a presença de *Listeria* spp. em 41,7% (5/12) das amostras, sendo a totalidade dos isolados, classificados como *L. innocua*. Ao comparar a contaminação presente nos dois cortes avaliados, foi possível verificar que o filé apresentou maior percentual de isolamento desse micro-organismo quando comparado com a alcatra, como demonstrado na Fig. 10.

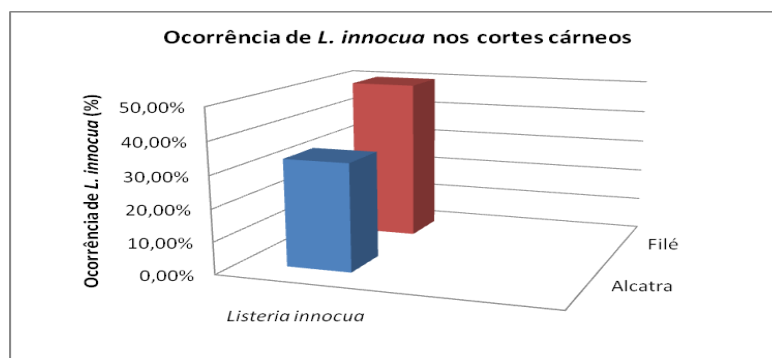


Figura 10 - Presença de *Listeria innocua* nos cortes finais de filé e alcatra amostrados no Frigorífico B.

A taxa de isolamento de *Listeria* spp. verificada nesse estudo em amostras provenientes de ambiente de processamento, é semelhante à referida por Barros et al. (2004) que, ao analisarem amostras originárias de equipamentos/utensílios e instalações de plantas processadoras de carne bovina, isolaram *Listeria* spp. em 48 amostras (33,70%), sendo *L. innocua* identificada em 33 amostras (68,75%).

A ocorrência de *L. innocua* frente a outras espécies de *Listeria* verificada nas amostras de ambiente, está em concordância com vários trabalhos relatados, os quais também citam essa espécie como a mais comumente encontrada, tanto em

alimentos, quanto em amostras ambientais (AGUADO; VITAS; GARCÍA-JALON, 2004; BARBALHO et al., 2005; LIMA et al., 2005; NALÉRIO et al., 2009; VECCHIA et al., 2010).

A presença de *L. monocytogenes* na mesa e faca antes de iniciar o processamento, bem como na mesa durante as operações de corte, desperta grande preocupação, haja vista que representa risco ao consumidor, pela possibilidade de incorporação no produto final. Portanto, esse resultado denota risco potencial de contaminação cruzada, já que os utensílios em que foi verificada a presença de *L. monocytogenes*, entram em contato direto com os cortes finais.

A presença desse micro-organismo em superfícies que entram em contato com o alimento tem sido avaliada por diversos autores. Como exemplo citam-se os estudos de Dias (2008), onde 32,1% das cepas de *L. monocytogenes* identificadas em um abatedouro de aves, foram isoladas em superfícies que estavam em contato direto com o produto final e de Nalério et al. (2009) que avaliando a presença do patógeno na cadeia produtiva de frangos no sul do Rio Grande do Sul, observou a ocorrência de *L. monocytogenes* em 29,2% (7/24) das amostras representativas das superfícies que entram em contato com o alimento. Considerando o comportamento psicrófilo de *L. monocytogenes*, é possível inferir que sua presença na sala de cortes, tenha sido favorecida pelas baixas temperaturas predominantes no local. Nesse sentido, Chiarini (2007) sugeriu que a elevada ocorrência de *L. monocytogenes* em ganchos na sala de corte, poderia estar relacionada com a temperatura reduzida desse ambiente, propiciando a sobrevivência e multiplicação do micro-organismo.

O isolamento de *L. innocua* verificado nas mesas e facas antes do início das atividades, bem como, nas mãos durante as operações de corte, inferem que os manipuladores são carreadores potenciais de micro-organismos, podendo ser responsáveis por contaminações recorrentes no produto final. Nesse sentido, a presença de *L. innocua* observada também, nos cortes de filé e alcatra, denota a ocorrência de contaminação cruzada no ambiente de processamento do Frigorífico B.

Borch (2006) afirma que o ato de serrar na divisão da carcaça pode promover a transferência de bactérias da incisão retal e da cabeça para a carcaça, oferecendo riscos de contaminações. Contudo, neste estudo, foi possível verificar que as serras utilizadas para abertura do esterno (Serra A) e para divisão das carcaças (Serra B)

não estavam contaminadas com *Listeria* spp.. Resultado semelhante foi observado por Oliveira et al. (2010), que também não identificaram *Listeria* spp. em serras analisadas, e demonstraram que a água a 82°C utilizada para sanificação das serras, mostrou-se eficiente na redução da microbiota superficial existente, podendo ter controlado a contaminação por *Listeria* spp. Já Barros et al. (2004) verificaram a presença de um isolado de *L. welshimeri* na serra utilizada no ambiente de processamento.

Ainda que *L. monocytogenes* seja a espécie investigada no âmbito da inocuidade dos alimentos, a presença de outras espécies de *Listeria* pode ser interpretada como um indicativo de condições adequadas para a presença da espécie patogênica, portanto, seu isolamento deve ser considerado um risco no ambiente de processamento (FERRONATO, 2010).

Nesse contexto, a presença de *L. innocua* nos cortes finais de filé e alcatra, reveste-se de grande importância, demonstrando inclusive, a influência da planta de processamento na contaminação do produto final. Além disso, conforme descrito anteriormente, sua presença é um indicador da ocorrência de *L. monocytogenes*, cuja sobrevivência e multiplicação nesse tipo de produto (armazenado no frio e a vácuo) é perfeitamente possível, graças as suas características psicrotróficas e microaerófilas. Com exemplo, podem-se citar os trabalhos de França (2008), que isolou *L. monocytogenes* em 13% das amostras de cortes cárneos embalados a vácuo, e de Kasnowski (2004), que encontraram *L. innocua* e *L. monocytogenes* em amostras de alcatra bovina.

2. *E. coli* O157:H7

2.1 Carcaças Bovinas

Após a imunosseparação magnética das amostras provenientes do Frigorífico A, apenas uma das colônias caracterizadas bioquimicamente como sorbitol negativa, confirmou pertencer à espécie *E. coli* pelos testes bioquímicos do Enterokit B (Série EPM-MILI-Citrato). A partir da discriminação em nível de espécie que o Enterokit B permite, observou-se que 5,04% dos isolados foram caracterizados bioquimicamente como *Citrobacter* spp. e 11,8% como *Serratia* spp. O Enterokit B não permitiu a diferenciação de espécie em 82,4% dos isolados, sendo necessária a utilização de

testes bioquímicos complementares através do Enterokit C (Probac[®]). Contudo, não foi dada continuidade a essas provas, porque o objetivo do estudo era a confirmação bioquímica de isolados de *E. coli*. não fermentadoras de sorbitol e, não, a discriminação de outras enterobactérias. Na Fig. 11 apresentam-se os micro-organismos identificados bioquimicamente pelo Enterokit B isolados no Frigorífico A.

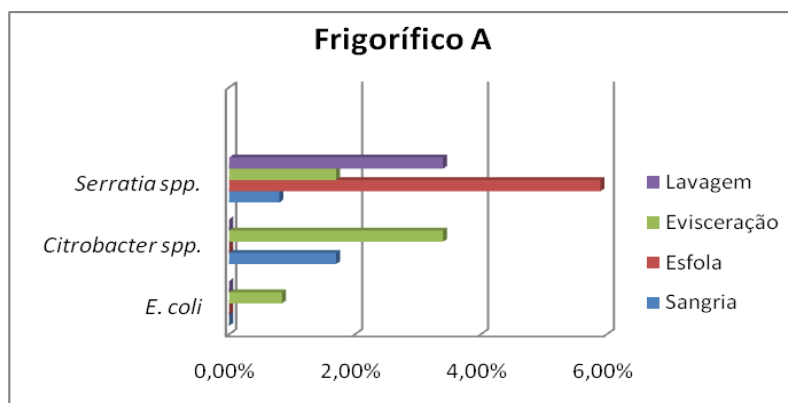


Figura 11 - Micro-organismos identificados pelo Enterokit-B nas etapas de abate de bovinos no Frigorífico A.

Já no frigorífico B, a partir da discriminação de espécie, observou-se que 3,7% dos isolados testados foram identificados bioquimicamente como *E. coli*, 2,2% como *Citrobacter spp.* e 0,7% como *Serratia spp.*, como indicado na Fig. 12.

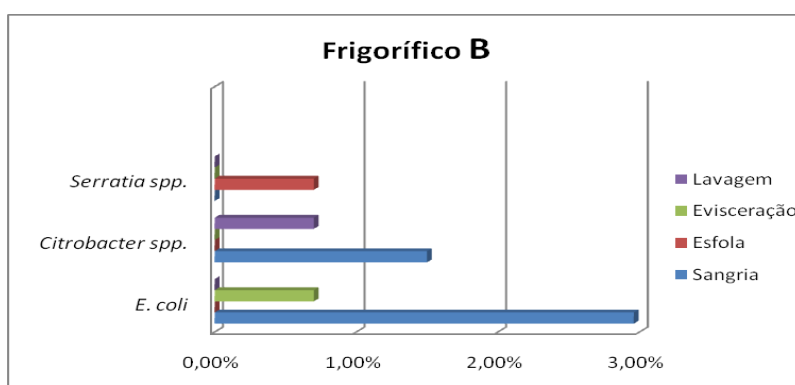


Figura 12 - Micro-organismos identificados pelo Enterokit-B nas etapas de abate de bovinos no Frigorífico B.

A partir da sorologia com anti-soro O157, foi observada reação positiva em 25% (2/8) dos isolados caracterizados como *E. coli*, oriundos de duas carcaças após a etapa de sangria (Ponto 1) no Frigorífico B.

A PCR desses isolados mostrou que as duas colônias suspeitas não apresentaram os genes compatíveis com o grupo das *E. coli* verotoxigênicas (STEC), como mostrado na tab. 5.

Tabela 5 - Perfil genotípico dos isolados de *E. coli*- sorbitol-negativa oriundos da etapa de sangria do Frigorífico B

	Presença dos genes				
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>uidA</i>	<i>eaeA</i>	<i>ehxA</i>
Isolado C3.1*	-	-	-	-	-
Isolado C4.1**	-	-	+	+	+

*isolado no ponto 1 da carcaça 3

**isolado no ponto 1 da carcaça 4

A partir da identificação de espécies pelo Enterokit B, observou-se que a ocorrência de *E. coli* nos dois estabelecimentos foi baixa (2,2% e 3,7% nos Frigoríficos A e B, respectivamente). Esse resultado é justificado pelo fato de que 80-93% das cepas de *E. coli* são fermentadoras do sorbitol (RATNAM, 1988) e, neste estudo, foram selecionadas apenas, colônias sorbitol negativas, as quais são características do sorotipo O157:H7.

Ao analisar os resultados obtidos na detecção dos genes associados à virulência, observa-se que o teste utilizado para a sorologia mostrou-se pouco específico, tendo em vista que os isolados submetidos a PCR aglutinaram na presença do anti-soro O157 e não apresentaram os genes característicos para o sorotipo O157:H7. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de que a espécie *Escherichia hermannii*, que pode ser isolada de fezes e alimentos como leite cru, também é uma cepa sorbitol negativa e apresenta aglutinação cruzada em teste com anticorpo O157 de *E. coli*, causando erros frequentes de diagnóstico (BORCZYK; KARMALI; LIOR, 1987).

Dessa forma, avaliando-se o perfil genotípico dos isolados pela técnica de PCR multiplex, verifica-se que estes não são *E. coli* O157:H7 por não apresentarem os genes *stx1* e *stx2*, os quais codificam para os fatores de virulência primários de *E. coli* verotoxigênicas, que são as shiga-toxinas Stx1 e Stx2 (COOMBES et al., 2008; MAURER; LAZIZZERA; MADEC, 2008; BAI; SHI; NAGARAJA, 2010; HUNT, 2010).

Um dos isolados apresentou os genes *uidA*, *eaeA* e *ehxA*, os quais codificam para a β -glucuronidase, intimina e entero-hemolisina, respectivamente. A

participação da entero-hemolisina na virulência de cepas de STEC ainda não está esclarecida (CHAHED et al., 2006) contudo, sabe-se que mesmo cepas que não produzem entero-hemolisina podem estar envolvidas em casos de infecções graves (KARMALI, 1989).

O gene *eaeA* detectado é um importante marcador de virulência de STEC que codifica para a intimina, proteína associada a lesão A/E (CHAHED et al., 2006). Esta lesão é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais e rearranjo do citoesqueleto celular, culminando na formação de uma estrutura semelhante a um pedestal onde a bactéria permanece ligada (MOXLEY; SMITH, 2010). Para alguns autores, cepas que não apresentam os genes que codificam para as shiga-toxinas, mas que possuem o gene *eaeA*, podem ser classificadas como EPEC típica, já que esse grupo também é capaz de produzir a lesão característica A/E (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004; BERTÃO; SARIDAKIS, 2007). Breum e Boel (2010) detectaram o gene *eaeA* em 81% das amostras Stx-positivas e em 46% de amostras Stx-negativas, isoladas em carcaças bovinas.

Ainda que não esteja diretamente relacionado à patogenicidade da bactéria, o gene *uidA* é utilizado como marcador molecular para o sorotipo O157:H7. Cepas O157:H7 apresentam o gene *uidA*, apesar de não exibirem atividade glucoronidásica, porém a sequência deste gene nestas cepas apresenta uma guanina na posição 92 no lugar de uma timina observada nos demais sorotipos. Este é um polimorfismo altamente conservado conhecido como polimorfismo de um único nucleotídeo (*single polymorphism nucleotide* – SNP), e que pode ser detectado por PCR com a utilização de um par de *primers* específico (CEBULA; PAYNE; FENG, 1995). Contudo, ainda que um dos isolados tenha apresentado o gene *uidA*, característico de O157:H7, a cepa não pode ser considerada STEC porque não apresentou os genes que codificam para a toxina de Shiga (*stx1* e *stx2*).

Dessa forma, verificou-se que das 60 carcaças amostradas nos Frigoríficos A e B, *E. coli* O157:H7 não foi isolada nos quatro pontos de amostragem da linha de abate de bovinos. Resultado semelhante foi verificado por Prata (2009), que visando comparar a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em amostras de fezes e de carcaças de animais provenientes de criação a pasto e em confinamento, também não isolou esse patógeno. Outros autores brasileiros relatam uma baixa prevalência desse sorotipo; no Estado de São Paulo, Irino et al. (2005), encontraram 0,6% de *E. coli* O157:H7 nas fezes de bovinos leiteiros jovens na região de Ribeirão Preto – SP,

Stella et al. (2008) isolaram *E. coli* em 430 amostras de fezes de bezerros e, dessas, duas foram confirmadas como O157:H7; Pigatto (2008) verificou que 37% das amostras de fezes de bovinos analisadas apresentaram-se positivas para o grupo STEC, sendo que do total de amostras testadas, nenhuma apresentou positividade para o sorogrupo O157.

Estudos conduzidos em outros países contrastam com os resultados obtidos nessa pesquisa. Elder et al. por exemplo, ao examinar bovinos de corte em frigoríficos nos EUA, antes e após o abate, isolaram *E. coli* O157:H7 em 28% das amostras de fezes, 11% na pele e, considerando a carcaça, em 43% antes da evisceração, 18% pós-evisceração e 2% após a lavagem pré-resfriamento da carcaça (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007). Breum e Boel (2010), também isolaram o sorotipo *E. coli* O157:H7 em 4,2% das amostras de carcaças bovinas amostradas em fazendas dinamarquesas. Ainda em países próximos como a Argentina, os resultados são contrastantes, haja vista que Etcheverría et al. (2010), ao avaliar a presença de STEC através da identificação dos genes *stx1* e *stx2*, verificaram 12,3% de amostras positivas em *swabs* de quartos dianteiros e traseiros de carcaças bovinas.

É interessante frisar que a não detecção de *E. coli* O157:H7 como contaminante na carcaça, contrasta com o elevado número de isolados detectados nas fezes diarréicas ou de animais saudáveis no Brasil (IRINO et al., 2005; RIGOBELLO et al., 2006; RIGOBELLO; SANTOS; MARIN, 2008). Sales (2006), analisou 100 amostras fecais de bovinos abatidos em São Luís, Maranhão, sendo que a taxa de isolamento de STEC foi de 73%. Vicente, Amaral e Cerqueira (2005) encontraram taxa ainda maior, com cepas STEC identificadas em todos os rebanhos analisados em Jaboticabal – SP, sendo os sorogrupos O157, O111 e O113 observados em 40%, 50% e 90% das amostras. Tristão et al. (2007) identificaram cepas STEC em 65% dos animais analisados no Estado do Rio de Janeiro e 28% no Estado do Rio Grande do Sul, sugerindo que bovinos saudáveis podem ser potenciais fontes de infecção para humanos.

Ao avaliar a presença de *E. coli* O157:H7 em carcaças bovinas e ovinas em abatedouros na Irlanda, Prendergast et al. (2011) verificaram a presença do patógeno em 7,6% das amostras de *swab* retal e em 3,9% das carcaças de bovinos. Nos ovinos, a contaminação pelo patógeno foi inferior, correspondendo a 5,8% das amostras de *swab* retal e em 2,9% das carcaças.

Ainda que o patógeno não tenha sido isolado após a etapa de sangria, o couro é a principal fonte de contaminação das carcaças bovinas por *E. coli* O157:H7 no momento do abate (ARTHUR et al., 2008; ARTHUR et al., 2009; KALCHAYANAND et al., 2009; BOSILEVAC et al., 2009). Kalchayanand et al. (2009) verificaram a prevalência desse micro-organismo no couro de bovinos em 77,5% de abatedouros frigoríficos nos Estados Unidos, da mesma forma que Bosilevac et al. (2009), os quais encontraram prevalência próxima a esse valor (70,9%).

De acordo com Bosilevac et al. (2009), as taxas de contaminação das carcaças, após a esfolagem, estão diretamente relacionadas com os níveis de contaminação que entram no abatedouro, evidenciando que o ambiente dos currais de espera também contribuem significativamente para a elevada carga de bactérias patogênicas, como O157:H7, na pele de animais levados para abate (ARTHUR et al., 2008). Segundo Arthur et al. (2008), o uso de banho de aspersão antes do abate contribui para a redução dos níveis de patógenos na pele dos animais. Outros estudos demonstraram que os pisos dos currais podem albergar *E. coli* O157:H7 de um dia para o outro, mesmo depois dos processos de limpeza de rotina terem sido realizados (SMALL et al., 2006; TUTENEL et al., 2003).

Considerando que os bovinos são o reservatório primário de O157:H7 e dos demais sorogrupos de STEC, carregando o micro-organismo muitas vezes, sem demonstrar sintomatologia (RIGOBELLO et al., 2006; HUNT, 2010), é inevitável que a evisceração seja considerada um ponto suscetível a contaminação pelo patógeno. Contudo, neste estudo, não se detectou a presença do micro-organismo nas carcaças após o processo de evisceração, o que também foi observado por Rigobello et al. (2006) que não encontraram *E. coli* produtoras da toxina de Shiga em 80 carcaças antes e após a evisceração.

A contaminação das carcaças e do ambiente de abate com *E. coli* O157:H7 proveniente do conteúdo intestinal de bovinos é um dos fatores de risco mais importantes na sua transmissão para humanos (GUN et al., 2003). Essa contaminação ocorre quando boas práticas de produção não são empregadas e há o extravasamento do conteúdo intestinal dos animais durante o abate (YILMAZ et al., 2006).

Ao avaliar a presença de *E. coli* O157:H7 durante o processamento de carcaças de Búfalo, Li, Sherwood e Logue (2004) verificaram que nenhuma das 116 carcaças após a lavagem, foram positivas em relação a presença do patógeno,

denotando eficiência do processo, já que o sorotipo foi solado em uma carcaça após a etapa de evisceração. Contudo, nesse estudo não foi possível avaliar a eficiência da lavagem em relação à presença de *E. coli* O157:H7, haja vista que o patógeno não foi isolado nas etapas anteriores.

2.2 Ambiente de processamento e cortes cárneos embalados a vácuo

Após a imunosseparação magnética das amostras provenientes de ambiente e cortes finais (filé e alcatra), nenhuma das colônias caracterizadas como sorbitol negativa, confirmou pertencer à espécie *E. coli* pelos testes bioquímicos do Enterokit B (Série EPM-MILI-Citrato). A partir da discriminação em nível de espécie, observou-se que 4,8% dos isolados foram caracterizados bioquimicamente como *Hafnia* spp. e 9,5% como *Serratia* spp., ambos isolados de do corte filé, conforme indicado na Fig. 13.

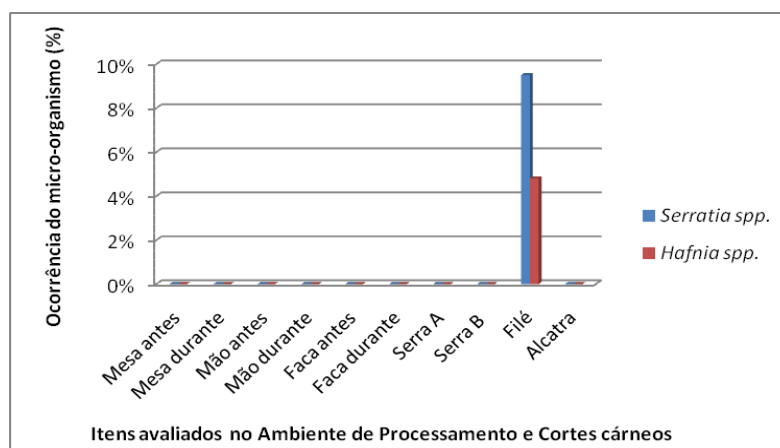


Figura 13 - Micro-organismos identificados pelo Enterokit-B no ambiente de processamento e nos cortes cárneos embalados à vácuo no Frigorífico B

A partir dos resultados, demonstra-se que no Frigoríficos B, o ambiente de processamento não é um fator de risco para os cortes finais, em relação à contaminação por *E. coli* O157:H7, tendo em vista que o patógeno não foi isolado nesses pontos de amostragem. Esse resultado é relevante porque há relatos de que cepas STEC podem sobreviver por períodos longos no ambiente de abate em superfícies de aço inoxidável ou plástico (ERICKSON; DOYLE, 2007). Silagyi et al. (2009), por exemplo, sugerem que a formação de biofilme por *E. coli* O157:H7 em

superfícies de contato com os alimentos, seja uma preocupação no controle eficiente do patógeno.

Avery et al. (2004) relatam que a contaminação cruzada pode, inclusive, ser causada pelos manipuladores em decorrência da possibilidade de humanos serem portadores de STEC. Reforçando essa hipótese, Stephan, Ragetti e Untermann (2000) isolaram 47 cepas de STEC de amostras de fezes de 47 trabalhadores saudáveis em três indústrias processadoras de carne na Suíça, e através da PCR, detectaram a presença do gene *stx* em 3,5% das 5.590 amostras de fezes pesquisadas.

Considerando que os bovinos são o reservatório primário de O157:H7 (HUNT, 2010), as serras utilizadas durante a evisceração das carcaças podem oferecer riscos de contaminação quando falhas operacionais ocorrem durante essa etapa (YILMAZ et al., 2006). Contudo, neste estudo não foi verificada a presença do patógeno nas serras A e B utilizadas na remoção das vísceras das carcaças bovinas do Abatedouro B.

Mesmo sendo a carne bovina o alimento mais associado com surtos por *E. coli* O157 e *E. coli* não O157 (SARTZ et al., 2008; ETHELBERG et al., 2009), os cortes finais embalados à vácuo (filé e alcatra) amostrados nessa pesquisa, apresentaram-se livres de contaminação pelo micro-organismo. Ainda que esse resultado tenha sido satisfatório, é ressaltada a importância do controle microbiológico para assegurar a inocuidade da carne em toda sua cadeia produtiva (SOFOS; GEORNARAS, 2010).

Na Argentina, Etcheverría et al (2010) observaram que 25% da carne bovina avaliada no varejo apresentava-se contaminada por STEC. Estudos recentes conduzidos por Ateba e Mbewe (2011), apontaram maior prevalência de *E. coli* O157:H7 em suínos e carne suína (67,7%) quando comparada com bovinos e carne bovina, onde a prevalência registrada foi de 27,7%. Em amostras de carne moída e almôndegas adquiridas na Província de Samsun, na Turquia, Cadircı et al. (2010), verificaram que *E. coli* O157 foi detectada em cinco das 200 amostras testadas (2,5%), sendo um isolado de carne moída e quatro, de almôndegas.

Prata (2009) verificou uma frequência baixa de contaminação pelo patógeno nos recortes cárneos avaliados, onde apenas uma amostra apresentou-se positiva para *E. coli* O157:H7, com frequência de 1,49%. Kasnowski (2004), ao avaliar a

presença de *E. coli* patogênicas em corte de alcatra e em alcatra moída, verificou que uma amostra do corte cárneo apresentou-se contaminada por EHEC. Esse resultado denota perigo do ponto de vista de saúde pública, haja vista que para *E. coli* O157:H7, a dose infectante pode ser inferior a 10UFC (ARMSTRONG; HOLLINGSWORTH; MORRIS, 1996). Assim, embora não existam padrões microbiológicos estabelecidos para *E. coli* O157:H7 na legislação brasileira, a presença de 1 a 10UFC.mL⁻¹ pode ser capaz de causar doença no homem e, desse modo, não deve ser permitida a sua presença em nenhuma amostra de alimento (ausência em 25g ou 25mL).

Ressalta-se que foi detectada a presença de 9,5% de *Serratia* spp. e 4,8% de *Hafnia* spp. em amostras dos cortes finais embalados a vácuo. Muitos membros da família *Enterobacteriaceae* como *Serratia* spp. e *Hafnia* spp., podem eventualmente, atuar como patógenos oportunistas podendo ser responsáveis ainda, pela deterioração em carnes refrigeradas embaladas a vácuo (JAY; VILAI; HUGHES, 2003; FELIPE, 2008). Segundo Felipe (2008), os alimentos comumente contaminados por *Hafnia* spp. incluem recortes de carne, carne bovina embalada a vácuo e produtos de suínos.

3. Micro-organismos Indicadores de Higiene

3.1 Carcaças bovinas

Os resultados das contagens médias de micro-organismos indicadores nas carcaças bovinas coletadas no Frigorífico A, podem ser visualizados nas Fig. 14 e 15.

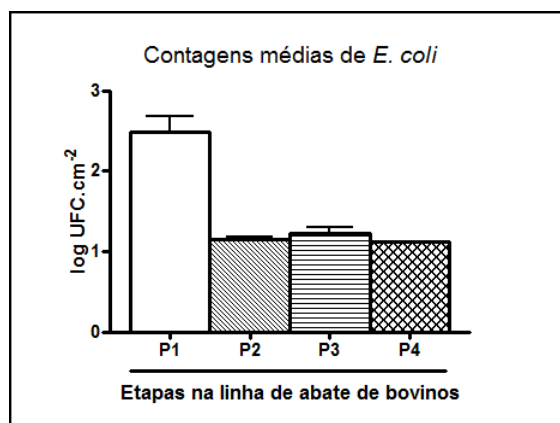


Figura 14 – Contagens médias de *E. coli* a 35(±1)°C na superfície de carcaças bovinas abatidas no Frigorífico A, durante as operações de sangria (P1), esfolia (P2), evisceração (P3) e lavagem pré-resfriamento (P4).

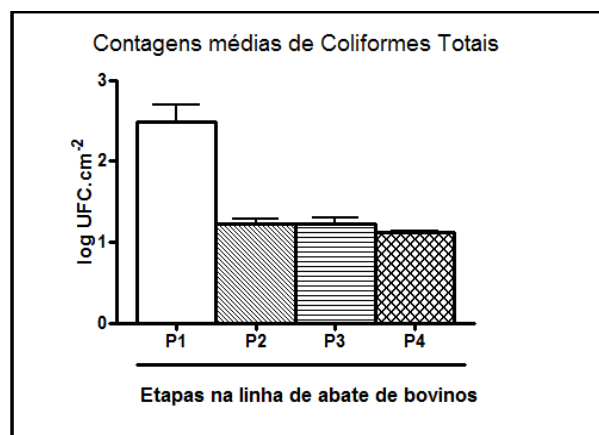


Figura 15 - Contagem médias de coliformes totais a $35(\pm 1)^{\circ}\text{C}$ na superfície de carcaças bovinas no Frigorífico A, durante as operações de sangria (P1), esfolagem (P2), evisceração (P3) e lavagem pré-resfriamento (P4)

Nas Fig. 16 e 17 são apresentados os resultados das contagens médias de micro-organismos indicadores nas amostras de carcaças bovinas coletadas no Frigorífico B.

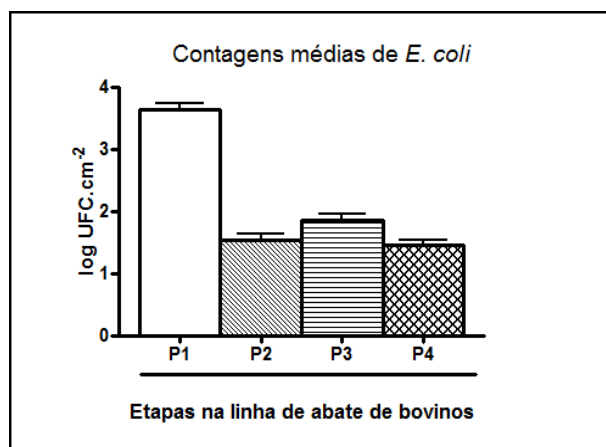


Figura 16 - Contagens médias de *E. coli* a $35(\pm 1)^{\circ}\text{C}$ na superfície de carcaças bovinas abatidas no Frigorífico B, durante as operações de sangria (P1), esfolagem (P2), evisceração (P3) e lavagem pré-resfriamento (P4).

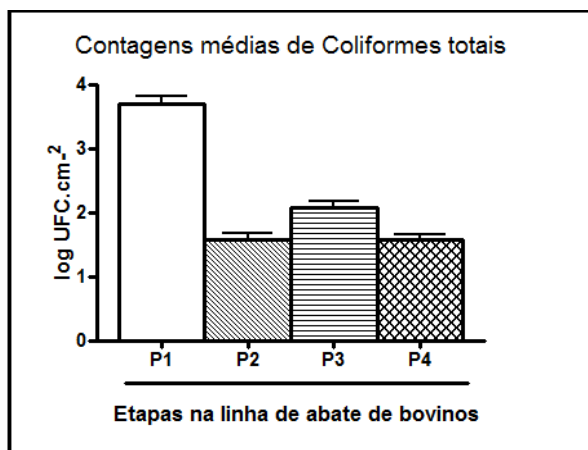


Figura 17 - Contagens médias de coliformes totais a 35(±1)°C na superfície de carcaças bovinas no Frigorífico B, durante as operações de sangria (P1), esfolagem (P2), evisceração (P3) e lavagem pré-resfriamento (P4).

Considerando os resultados obtidos pelo teste Newman-Keuls, foi possível verificar que no Frigorífico B, não houve diferença significativa na contaminação por *E. coli* e coliformes totais nas etapas após a esfolagem e após lavagem pré-resfriamento das carcaças ($p > 0,05$). Já no Frigorífico A, apenas a contaminação registrada após a sangria diferiu significativamente em relação aos demais pontos amostrados ($p < 0,01$). Neste último frigorífico, as contagens médias verificadas nos pontos equivalentes a esfolagem, evisceração e lavagem não diferiram estatisticamente entre si, demonstrando que após o Ponto 1 verificou-se uma redução na contaminação, a qual manteve-se constante ao longo das etapas de abate.

Nas tab. 6 e 7 comparam-se as contagens médias de *E. coli* e coliformes totais verificadas nos pontos de amostragem nos Frigoríficos A e B.

Tabela 6 - Contagens médias de *E. coli* (log UFC.cm⁻²) verificadas após as operações de sangria, esfolagem, evisceração e lavagem das carcaças nos Frigoríficos A e B.

	Sangria	Esfolagem	Evisceração	Lavagem
Frigorífico A	2,47 ± 0,92	1,14 ± 0,15	1,22 ± 0,37	1,14 ± 0,00001
Frigorífico B	3,63 ± 0,67	1,52 ± 0,63	1,85 ± 0,62	1,46 ± 0,46

(one way ANOVA//Neuman-Keuls)

Tabela 7 - Contagens médias (log UFC.cm⁻²) de coliformes totais verificadas após as operações de sangria, esfolagem, evisceração e lavagem das carcaças nos Frigoríficos A e B.

	Sangria	Esfola	Evisceração	Lavagem
Frigorífico A	2,49 ± 0,94	1,2 ± 0,29	1,2 ± 0,37	1,12 ± 0,06
Frigorífico B	3,70 ± 0,69	1,57 ± 0,67	2,07 ± 0,65	1,56 ± 0,53

(one way ANOVA/Neuman-Keuls)

É válido ressaltar que a legislação brasileira não estabelece padrões para a contaminação por coliformes totais e *E. coli* em carcaças bovinas, portanto, as contagens obtidas nas carcaças ao longo da linha de abate, serão comparados com resultados obtidos em pesquisas semelhantes.

Conforme pode ser observado nas tab. 5 e 6, as amostragens após a sangria, foram as que apresentaram as maiores concentrações microbianas para *E. coli* e coliformes totais, tanto no Frigorífico A quanto no Frigorífico B. Isso pode ser justificado pelo fato da amostragem ter sido realizada no couro e este ser carreador de fezes e demais sujidades, contribuindo para o aumento da carga microbiana.

Jardim, Silva e Ramos (2004), analisaram 20 carcaças bovinas em três etapas do processo de abate, e também encontraram valores médios superiores após a sangria, quando comparados a outras etapas, tanto para coliformes totais (1,23 log UFC.cm⁻²) como para *E. coli* (0,75 log UFC.cm⁻²). Resultado semelhante foi obtido por Jardim et al. (2006) que verificaram contagens médias de 1,27 e 0,86 log₁₀ UFC.cm⁻² para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente, antes da etapa de esfolagem, indicando que o couro é uma importante fonte de contaminação.

Na amostragem após a esfolagem verificou-se uma redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis de concentração microbiana, com média de 1,2 log UFC.cm⁻² para coliformes totais e 1,14 log UFC.cm⁻² para contagem de *E. coli*. no Frigorífico A, e 1,57 log UFC.cm⁻² para coliformes totais e 1,52 log UFC.cm⁻² para *E. coli*, no Frigorífico B, indicando que no processo de retirada do couro foram carreados parte dos micro-organismos presentes para a carcaça.

Com objetivo de identificar pontos críticos de controle no processo de produção de carne moída, Gill, Bryant e Landers (2003) analisaram 25 carcaças bovinas após a esfolagem em um abatedouro, e obtiveram valores médios de 3,27 log₁₀ UFC.2.500 cm⁻² para coliformes totais e 3,16 log₁₀ UFC.2.500 cm⁻² para *E. coli*.

A população microbiana na superfície de carcaças bovinas em diferentes estágios do abate foi determinada por Bacon et al. (2000), os quais obtiveram valores ($\log \text{UFC.cm}^{-2}$) variando de 4,0 a 5,9 para coliformes totais e 3,5 a 5,5 para *E. coli* nas carcaças antes da esfola (couro). O nível de contaminação observado após a esfola estava na faixa de 1,0 a 4,0 e 0,6 a 3,3 $\log \text{UFC.cm}^{-2}$, respectivamente, para coliformes totais e *E. coli*.

Observou-se que no Frigorífico A não houve diferença estatística na contaminação por micro-organismos indicadores de higiene entre as etapas de esfola e evisceração, inferindo que o processo de remoção das vísceras não elevou a carga microbiana das carcaças. Porém, no Frigorífico B, verificou-se um aumento significativo na contaminação após a evisceração quando comparado à etapa da esfola. As contagens médias para coliformes totais e *E. coli* foram de 2,07 $\log \text{UFC.cm}^{-2}$ e 1,85 $\log \text{UFC.cm}^{-2}$, respectivamente. Este fato pode ser resultante de contaminação cruzada pelo contato com utensílios e equipamentos contaminados, além do intenso manuseio ao qual a carcaça é submetida. Aliado a isso, micro-organismos podem contaminar a carcaça durante a evisceração devido ao contato com conteúdo gastrointestinal e à contaminação oral esofásica (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 2006; JARDIM et al., 2006).

Jardim et al., (2006) avaliaram 40 bovinos durante as operações de abate (antes da esfola, após a esfola e após a lavagem) e observaram aumento discreto nas contagens médias de micro-organismos indicadores nas etapas após a esfola, indicando que os processos subsequentes à remoção do couro constituíam prováveis fontes de contaminação, como a evisceração, que é considerada um ponto crítico no processo.

No Frigorífico B verificou-se que na etapa de lavagem das carcaças antes de entrarem na refrigeração, houve diminuição significativa das concentrações microbianas para coliformes totais e *E.coli*, quando comparadas as amostragens realizadas após evisceração. No Frigorífico A não houve diferença estatística na contagem desses micro-organismos entre os Pontos 3 (evisceração) e 4 (lavagem). Contudo, vale ressaltar que a contaminação por coliformes e *E. coli* foi maior no Frigorífico B, em todos os pontos de amostragens, refletindo as diferenças existentes no rigor do controle sanitário em estabelecimentos com distintos níveis de inspeção.

Baseando-se nos critérios do *Meat Industry Guidelines* (FOOD STANDARDS AGENCY, 2002) para coliformes totais e *E. coli*, os quais consideram contagens satisfatórias quando o log10 é menor que 0,8, aceitável entre 0,8 e 1,8 e insatisfatório quando o log10 é maior que 1,8, verifica-se que os resultados obtidos após a etapa de lavagem, em ambos os Frigoríficos avaliados, são considerados aceitáveis quanto a presença desses micro-organismos. Contudo, as concentrações microbianas após a lavagem, são classificadas como satisfatórias ao comparar os valores obtidos com os critérios estabelecidos pelo MAPA, quando iniciou a implantação dos programas APPCC e de Redução de Patógenos, o qual considerava satisfatório, contagens de *E. coli* menores ou iguais a 2 log UFC.cm⁻² (PRATA, 2009).

As contagens médias (log10 UFC.cm⁻²) obtidas por JARDIM et al. (2006) para coliformes totais e *E. coli*, após a lavagem das carcaças, foram inferiores as verificadas nesse estudo, sendo 0,55 e 0,42 log10 UFC.cm⁻² respectivamente. Estudo semelhante avaliando as condições bacteriológicas de 50 carcaças bovinas após a etapa de lavagem, foi conduzido por Gill et al. (2000), os quais obtiveram contagens médias de 2,00 log UFC.100cm⁻² para coliformes e 1,50 log UFC.100cm⁻² para *E. coli*.

Ao avaliar a presença de micro-organismos indicadores em carcaças resfriadas de bovinos terminados a pasto e em confinamento, Prata (2009) constatou que 15% das amostras apresentaram valores acima de 0,8 log10 UFC.cm⁻² para coliformes totais, e 7% delas tiveram concentrações superiores a 0,8 log10 UFC.cm⁻² para *E. coli*. Os resultados obtidos por Barros (2005) (1,49 log UFC.cm⁻² para coliformes totais em carcaças bovinas refrigeradas) estão em concordância com os valores verificados nesse estudo, por outro lado, as médias logarítmicas para *E. coli* (0,41 logUFC.cm⁻²) observadas por Phillips et al. (2001) em carcaças bovinas em abatedouros australianos, apontaram concentrações bacterianas inferiores em relação as verificadas nessa pesquisa.

Sumner et al. (2003) avaliaram 159 carcaças bovinas em abatedouros de diferentes portes na Austrália, e também obtiveram médias logarítmicas para contaminação por *E. coli* inferiores às deste estudo, as quais equivaleram a 0,33 log UFC.cm⁻². Rigobelo et al. (2008) pesquisaram a contaminação por *E. coli* em carcaças bovinas durante as estações de chuva e seca, verificando que na etapa após a lavagem, 37 (32%) carcaças amostradas apresentaram *E. coli*.

Os resultados encontrados nesta pesquisa corroboram com os obtidos por Jardim et al. (2006), que investigaram micro-organismos indicadores na pele e superfície de carcaças, e obtiveram níveis muito semelhantes de coliformes totais e *E. coli*, tanto no couro como nas carcaças.

A partir desses resultados ressalta-se a importância da eliminação e/ou minimização da ocorrência de contaminações cruzadas, já que elevadas concentrações de micro-organismos indicadores de higiene, inferem a presença de bactérias potencialmente patogênicas, tais como *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

As maiores concentrações microbianas encontravam-se na sangria, o que reflete a importância do controle efetivo dessa etapa, visando a qualidade microbiológica e a inocuidade da carcaça. No Frigorífico B, verificou-se aumento da carga microbiana após a evisceração, ressaltando que, neste estabelecimento, há necessidade de monitoramento dessa etapa, haja vista que diversos micro-organismos de origem entérica podem contaminar a carcaça se essa operação não for realizada adequadamente. Observou-se, ainda, que as etapas de esfolagem e lavagem da carcaça antes do resfriamento, são fundamentais para minimizar a concentração microbiana adquirida durante as etapas de abate.

3.2 Ambiente de processamento e cortes cárneos embalados à vácuo

Os resultados das contagens médias de micro-organismos indicadores nos cortes cárneos e no ambiente de processamento, amostrados no Frigorífico B, podem ser visualizados nas Fig. 18 e 19.

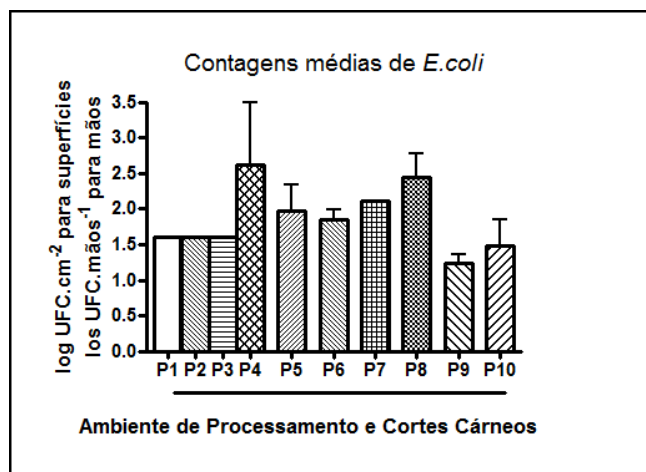


Figura 18 - Contagens médias de *E. coli* no ambiente e em cortes cárneos amostrados no Frigorífico B: P1 (Mesa Antes do Processamento), P2 (Mesa Durante o Processamento), P3 (Faca Antes do Processamento), P4 (faca Durante o Processamento), P5 (Serra A, de abertura do esterno), P6 (Serra B, de divisão das carcaças), P7 (Mão antes do Processamento), P8 (Mão Durante o Processamento), P9 (Alcatra) e P10 (Filé).

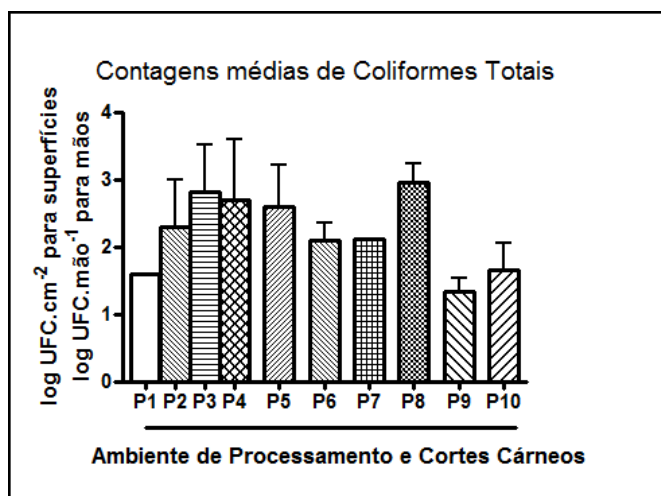


Figura 19 - Contagens médias de coliformes totais no ambiente e cortes cárneos amostrados no Frigorífico B: P1 (Mesa Antes do Processamento), P2 (Mesa Durante o Processamento), P3 (Faca Antes do Processamento), P4 (faca Durante o Processamento), P5 (Serra A, de abertura do esterno), P6 (Serra B, de divisão das carcaças), P7 (Mão antes do Processamento), P8 (Mão Durante o Processamento), P9 (Alcatra) e P10 (Filé).

Na tab. 8 comparam-se as contagens médias e o desvio-padrão obtidos na enumeração de *E. coli* e coliformes totais no ambiente de processamento e em cortes cárneos.

Tabela 8 - Contagens médias de *E. coli* e de coliformes totais (log UFC.cm⁻² para superfícies e log UFC.mão⁻¹ para as mãos) no ambiente de processamento e em cortes cárneos amostrados no Frigorífico B.

Pontos de amostragem de ambiente e cortes cárneos										
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
<i>E.coli</i>	1,602	1,602	1,602	2,618	1,968	1,843	2,114	2,447	1,241	1,485
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,000	0,000	0,000	1,952	0,818	0,329	0,000	0,744	0,310	0,909
Coliformes totais	1,602	2,297	2,806	2,703	2,597	2,097	2,114	2,962	1,328	1,655
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,000	1,555	1,573	1,973	1,396	0,573	0,000	0,628	0,524	0,978

*P1 (Mesa Antes do Processamento), P2 (Mesa Durante o Processamento), P3 (Faca Antes do Processamento), P4 (faca Durante o Processamento), P5 (Serra A, de abertura do esterno), P6 (Serra B, de divisão das carcaças), P7 (Mão antes do Processamento), P8 (Mão Durante o Processamento), P9 (Alcatra) e P10 (Filé).

(one way ANOVA//Neuman-Keuls)

Considerando os resultados obtidos pelo teste Newman-Keuls, observou-se que não houve diferença estatística entre a contaminação por *E. coli* verificada nas amostras de ambiente de processamento e nos cortes finais ($p > 0,05$). Resultado semelhante foi obtido comparando as contagens de coliformes totais, as quais também não diferiram significativamente entre si. Portanto, observou-se que há relação direta entre as concentrações dos micro-organismos indicadores de higiene nos cortes de filé mignon e alcatra, com aquelas encontradas nas superfícies que entram em contato com a carne no processamento.

A análise das médias das contagens dos micro-organismos indicadores pesquisados por Barros (2005) em produtos cárneos, demonstrou que as contaminações aumentaram a medida que a carne foi sendo processada. O autor concluiu que as concentrações microbianas das carcaças e dos cortes foram menores que as contaminações da carne moída e dos embutidos, indicando incorporação de micro-organismos ao longo do processamento. Os resultados obtidos por Barros (2005) estão em concordância com os observados nesta pesquisa, haja vista que comparando a contaminação média das carcaças após a lavagem pré-resfriamento no Frigorífico B ($1,46 \pm 0,46$ log UFC.cm⁻² para *E. coli* e $1,56 \pm 0,53$ log UFC.cm⁻² para coliformes totais) com as contagens médias verificadas nos cortes finais (filé e alcatra), fica evidente que o ambiente de

processamento (utensílios e manipuladores) contribui para o aumento nas concentrações bacterianas do produto final.

Prata (2009) relata que o Serviço de Inspeção de Produtos Agropecuários (SIPAG), do Estado de São Paulo, classifica os cortes de carne bovina *in natura*, com relação a coliformes totais, em ideal ($<3,0 \log_{10}$), tolerável ($3,0-4,0 \log_{10}$) e intolerável ($>4,0 \log_{10}$). Nesse sentido, observa-se que as amostras de cortes cárneos avaliados (filé e alcatra) apresentaram contagens médias dentro do parâmetro considerado “ideal” quanto à enumeração de coliformes totais. Considerando as contagens de *E. coli*, o SIPAG considera resultados ideais quando os valores registrados apresentam-se abaixo de $1,0 \log_{10}$, toleráveis acima de $1,0 \log_{10}$, e intoleráveis para contagens superiores a $2,0 \log_{10}$ (PRATA, 2009). Com base no exposto, nesse quesito, os cortes de filé e alcatra se enquadram na classificação considerada “tolerável”, visto que as contagens médias de *E. coli*, foram de $1,485 \pm 0,909 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ e $1,241 \pm 0,310 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$, respectivamente.

Ainda que a contaminação verificada nos cortes tenha sido considerada ideal em relação às contagens de coliformes, e tolerável quanto a presença de *E. coli*, infere-se que a carga microbiana existente seja resultante de contaminação cruzada pelo contato com a superfície de utensílios e, principalmente, com as mãos dos manipuladores durante a execução dos cortes, devido ao intenso manuseio a que os estes são submetidos.

Barros (2005) avaliou microbiologicamente 443 amostras de carne bovina, provenientes da região norte do Paraná, e observou que a concentração de coliformes totais variou de 2 a $4 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ e, para *E. coli*, os valores foram menores que $2 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$, semelhante aos resultados obtidos nessa pesquisa. Esse mesmo autor avaliou a contaminação por micro-organismos indicadores de higiene em plantas de processamento de carne bovina *in natura*, e verificou que a média de contaminação por coliformes totais nos equipamentos foi de $2,55 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ com valores mínimos abaixo de $1 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ e máximos de $7 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$. Segundo aquele autor, a média das contagens de *E. coli* foi de $1,80 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$, com níveis mínimos de $0,48 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ e máximos de $5,72 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$. Os equipamentos com as maiores médias de contaminação por *E. coli* foram ganchos, misturadores, moedores, facas e cubas de aço inoxidável.

Barros et al. (2007b) registraram contagens médias de coliformes totais e de *E. coli*, inferiores (2,36 e 1,93 log UFC.cm⁻²) as encontradas nas amostras de facas nesse estudo (2,703 e 2,618 log UFC.cm⁻², respectivamente). Os autores verificaram que nos estabelecimentos avaliados não era realizada a higienização das facas durante os procedimentos de desossa e preparo de cortes, sendo que somente em algumas plataformas (sangria, evisceração e linha de inspeção) era realizada a imersão das facas em água quente.

O autor constatou ainda, que a contaminação por coliformes totais e por *E. coli* nas mesas utilizadas na desossa foi de 2,50 e 1,73 log UFC.cm⁻², respectivamente, valores semelhantes as contagens obtidas neste estudo (2,297 e 1,602 log UFC.cm⁻²). Em contrapartida, os valores verificados em serras, tanto para *E. coli* (1,29 log UFC.cm⁻²) quanto para coliformes totais (1,95 log UFC.cm⁻²) estavam abaixo dos resultados desta pesquisa, onde as Serras A e B apresentaram 1,968 e 1,843 log UFC.cm⁻² para *E. coli* e 2,597 e 2,097 log UFC.cm⁻² para coliformes totais, respectivamente (BARROS et al. 2007b).

Observando-se os resultados das análises da quantificação de *E. coli* nas mãos dos manipuladores, tem-se um quadro preocupante no Frigorífico avaliado, haja vista que estas apresentavam-se contaminadas com esse micro-organismo, mesmo antes de se iniciar o processamento: as médias encontradas foram de 2,114 logUFC.mão⁻¹ antes de iniciar o processo e 2,447 logUFC.mão⁻¹ durante as operações de corte. Esses resultados denotam higienização inadequada e falta de informação correta dos manipuladores, os quais contribuem, portanto, para o aumento na concentração microbiana, inclusive com patógenos, dos cortes finais.

Segundo Silva Junior (2001), para que a higiene das mãos seja considerada satisfatória há necessidade da ausência de coliformes a 45°C. Contudo, esses micro-organismos têm sido frequentemente isolados das mãos dos manipuladores de alimentos (OLIVEIRA; VIEIRA, 2003) refletindo um perfil higiênico-sanitário insatisfatório quanto à contaminação microbiana (OLIVEIRA et al., 2008), e evidenciando a importância da orientação do manipulador de alimentos, particularmente sobre Boas Práticas de Fabricação (GOMES-NEVES et al., 2011)

Oliveira et al. (2008), avaliaram as condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne e de mãos de manipuladores, encontrando valores de coliformes a 45°C semelhantes aos verificados nas mãos dos manipuladores neste estudo, os quais oscilaram entre 1,17 e 3,66 logUFC.mão⁻¹. Mesquita et al. (2006)

concluíram que a contaminação de bancadas e de mãos de manipuladores por coliformes a 45°C em Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN), resultou da contaminação cruzada com a matéria-prima utilizada (frango *in-natura*), visto que antes de iniciar o processamento, o micro-organismo não foi identificado nesses pontos de amostragem.

4. Relação entre a presença de *L. monocytogenes* e micro-organismos indicadores de higiene

Ao avaliar-se a concentração de micro-organismos indicadores de higiene nas duas carcaças em que *L. monocytogenes* foi isolada (Frigorífico B), verificou-se contagens médias de 1,81 log UFC.cm⁻² para *E. coli* e 1,84 log UFC.cm⁻² para coliformes totais. Considerando os pontos em que *L. innocua* foi isolada no Frigorífico B, observaram-se concentrações médias superiores de micro-organismos indicadores (3,00 log UFC.cm⁻² para *E. coli* e 3,07 log UFC.cm⁻² para coliformes totais). Essas diferenças são atribuídas ao fato dos isolados de *L. monocytogenes* serem oriundos de carcaças amostradas após a lavagem, enquanto que 60% dos isolados de *L. innocua* foram identificados após a sangria, que corresponde a etapa cuja contaminação foi mais significativa em relação aos demais pontos amostrados.

Comportamento semelhante foi observado no Frigorífico A, em que 87,5% dos isolados de *L. innocua* foram detectados na etapa imediatamente após a sangria, a qual corresponde ao ponto em que se observou as maiores concentrações bacterianas durante a linha de abate. Nas carcaças contaminadas com *L. innocua*, a concentração média foi de 2,2 log UFC.cm⁻², tanto para *E. coli* como para coliformes totais.

Ao considerar as amostras do ambiente de processamento em que *L. monocytogenes* foi identificada (faca antes do início das atividades, mesas antes e durante o processamento dos cortes) observou-se concentrações médias de 1,6 log UFC.cm⁻² para *E. coli* e 1,8 log UFC.cm⁻² para coliformes totais. Nota-se que esses valores se assemelham as contagens médias de micro-organismos indicadores, registrados nas carcaças em que o patógeno foi isolado.

Nos cortes finais de filé mignon e alcatra nos quais se isolou *L. innocua*, as concentrações médias de *E. coli* e coliformes totais foram de 1,7 e 1,8 log UFC.cm⁻², respectivamente. Esses valores estão abaixo dos níveis de contaminação

encontrados por Barros (2005), em carnes e derivados cárneos, que encontrou níveis de contaminação por coliformes totais variando entre 2 a 4 log UFC.cm⁻² e concentrações de *E. coli* inferiores a 2 log UFC.cm⁻², nas amostras em que *L. innocua* foi isolada.

Nas amostras de ambiente de processamento que apresentaram presença de *L. innocua*, foram observadas concentrações microbianas superiores, tanto para *E. coli* como para coliformes totais (2,43 e 3,03 log UFC.cm⁻², respectivamente) quando comparadas as contagens médias verificadas nas amostras em que *L. monocytogenes* foi identificada.

Esses resultados são equiparáveis aos obtidos por Barros (2005) que isolou *L. innocua* em amostras de equipamentos e instalações nas quais se observaram predomínio de níveis elevados de contaminação por coliformes totais e *E. coli*. Em relação aos coliformes totais, os níveis de contaminação mais frequentes nas amostras avaliadas por aquele autor, foram maiores do que 4 log UFC.cm⁻² (66,7%) enquanto que as concentrações de *E. coli* estiveram acima de 3 log UFC.cm⁻² em 50% das amostras.

Neste contexto, infere-se que nos Frigoríficos avaliados, *L. innocua* aparentou ser mais adaptada ao ambiente do que *L. monocytogenes*, tendo em vista que a espécie não-patogênica foi isolada em amostras com elevadas concentrações de micro-organismos indicadores de higiene, denotando maior resistência frente a microbiota competidora. Em seu experimento, Pinto (2008) constatou que ainda que *L. innocua* tenha sofrido redução de um ciclo logarítmico, a microbiota endógena não foi capaz de eliminar o micro-organismo que demonstrou resistência frente a microbiota competidora.

O isolamento de *L. monocytogenes* não esteve associado à elevadas concentrações de micro-organismos indicadores, haja vista que as contagens obtidas para esses últimos micro-organismos denotam resultados satisfatórios, de acordo com Prata (2009). Esses resultados também corroboram a pesquisa realizada por Chiarini (2009) que observou que *L. monocytogenes* estava amplamente distribuída em diversas áreas de um abatedouro de aves, com maior ocorrência nas salas de corte, nas quais a limpeza era realizada com maior frequência quando comparada com as demais áreas avaliadas, o que reduzia a microbiota competidora e favorecia o desenvolvimento do patógeno.

Estudos têm demonstrado que amostras coletadas de superfícies visivelmente limpas apresentam maior presença de *L. monocytogenes* quando comparadas com amostras provenientes de superfícies com sujidades. Isso reforça a idéia errônea de que a limpeza inadequada na área de processamento pode contribuir para o aumento da população de outros micro-organismos, mas para a diminuição da ocorrência de *L. monocytogenes* (CHIARINI, 2007; LOPEZ et al, 2008). Nesse sentido, Al-Zeyara, Basil Jarvis e Mackey (2010) avaliaram o efeito inibitório da microbiota natural do alimento sobre o crescimento de *L. monocytogenes* em caldos de enriquecimento, e verificaram que a capacidade de baixos números de *L. monocytogenes* alcançarem altas concentrações de células é altamente dependente do número total e tipo de micro-organismo competidor inicialmente presente no meio.

Barros (2007a) avaliou a relação entre a presença de *Listeria* spp. e os níveis da microbiota acompanhante em carnes e plantas de processamento, e verificou que não houve interferência dos micro-organismos indicadores pesquisados, sobre a detecção de *L. monocytogenes*, haja vista que o patógeno foi isolado de amostras que apresentaram contaminação multiespécies em níveis elevados.

Comparando a enumeração de coliformes termotolerantes com a presença de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., Costa (2010) constatou que a presença dos patógenos foi mais expressiva nas amostras com maior número de coliformes termotolerantes, sendo que essa correlação ficou mais evidente para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., do que *Campylobacter* spp. Entretanto, o autor verificou que em 47,1% das amostras avaliadas, as contagens de coliformes termotolerantes foram inferiores a 3 NMP.g⁻¹ e, mesmo assim, apresentaram a presença dos patógenos, demonstrando que a ausência de bactérias indicadoras em produtos cárneos não significa ausência de micro-organismo patogênicos.

CONCLUSÕES

Nos Frigoríficos A e B, as etapas na linha de abate e o ambiente de processamento do Frigorífico B, não mostraram ser um fator de risco em relação à contaminação por *E. coli* O157:H7, visto que o patógeno não foi isolado nesses pontos de amostragem;

No frigorífico A, as espécies não patogênicas de *Listeria* foram isoladas somente após as etapas de sangria e evisceração, demonstrando que a lavagem foi eficiente na redução da contaminação microbiana adquirida durante as etapas de abate;

A presença de *L. monocytogenes* verificada após a etapa de lavagem e no ambiente de processamento no Frigorífico B, denota a necessidade de readequações dos processos operacionais;

As maiores concentrações de micro-organismos indicadores encontravam-se na sangria e, considerando o Frigorífico B, também após a evisceração, sendo estes pontos críticos com relação a contaminação microbiana das carcaças. As etapas de esfolagem e lavagem pré-resfriamento são fundamentais para minimizar a concentração bacteriana adquirida durante as etapas de abate;

Há relação direta entre as concentrações dos micro-organismos indicadores de higiene nos cortes de filé mignon e alcatra, com aquelas encontradas nas superfícies que entram em contato com a carne no processamento, demonstrando que utensílios e manipuladores contribuem para o aumento nas concentrações bacterianas do produto final;

A presença de *L. monocytogenes* esteve relacionada a amostras que apresentaram baixas concentrações microbianas de coliformes e *E. coli* inferindo que a redução da microbiota competidora favoreceu o desenvolvimento do patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABONGO, B.; MOMBA, M. N. B. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from meat and meat products sold in Amathole District, Eastern Cape Province of South Africa. **Food Microbiology**, n. 26, p.173–176, 2009.
- ABRAM, F.; STARR, E.; KARATZAS, K. A. G.; MATLAWSKA-WASOWSKA, K.; BOYD, A.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J.; CONNALLY, D.; O' BYRNE, C. P. Identification of Components of the Sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.22, p.6848-6858, 2008.
- ADRIÃO, A.; VIEIRA, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; SOL, M.; TENREIRO, R. P. Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, n.123, p.142-150, 2008.
- AGUADO, V.; VITAS, A. I.; GARCÍA-JALON, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **International Food Microbiology**, v.90, p.341-347, 2004.
- ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology Infection**, v.16, p.16-23, 2010.
- AL-ZEYARA, S. A.; JARVIS, B.; MACKEY, B. M. The inhibitory effect of natural microflora of food on growth of *Listeria monocytogenes* in enrichment broths. **International Journal of Food Microbiology**. (2010), doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.036
- AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.6, p.1139-1145, 2006.
- ARMSTRONG, G. L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS, J. G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, v.18, p.29-51, 1996.
- ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; GUERINI, M. N.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Transportation and lairage environment effects on prevalence, numbers, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on hides and carcasses of beef cattle at processing. **Journal of Food Protection**, v.70, p.280–286, 2007.
- ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; HARHAY, D.M.; KALCHAYANAND, N.; KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Source tracking of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* contamination in the lairage environment at commercial U.S. beef processing plants and identification of an effective intervention. **Journal of Food Protection**, v.71, n.9, p.1752-1760, 2008.

ARTHUR, T. M.; KEEN, J. E.; BOSILEVAC, J. M.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; NOU, X.; KOOHMARAI, M. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in a beef cattle feedlot and role of high-level shedders in hide contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.20, p. 6515-6523, 2009.

ATEBA, C. N.; MBEWE, M. Detection of *E. coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. **Research in Microbiology**. (2011), doi: 10.1016/j.resmic.2010.11.008

AUTIO, T.; KETO-TIMONEN, R.; LUNDÉN, J.; BJÖRKROTH, J.; KORKEALA, H. Characterisation of Persistent and Sporadic *Listeria monocytogenes* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). **Systematic Applied Microbiology**, v.26, p.539-545, 2003.

AVERY, S. M.; LIEBANA, E.; HUTCHISON, M. L.; BUNCIC, S. Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O157 isolates with beef cattle and comparison with unrelated isolates from animals, meat and humans. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p.161-169, 2004.

BACON, R. T.; BELK, K. E.; SOFOS, J. N.; CLAYTON, R. P.; REAGAN, J. O.; SMITH, G. C. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. **Journal of Food Protection**, v.63, n.8, p.1.080-1.086, 2000.

BAI, J.; SHI, X.; NAGARAJA, T. G. A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Microbiological Methods**, v.82, p.85–89, 2010.

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.

BARBALHO, Teresa Carla Ferreira. ***Listeria* spp. em abatedouro de frangos: Ocorrência, disseminação e proposição de um método rápido para confirmação e identificação das espécies**. 2002. 73f. **Dissertação (Mestrado em Nutrição)**- Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; HAGA, M. M.; CAVALETTI, L.; D'OVÍDIO, L.; MONTEIRO, F. A.; NERO, L. A. *Listeria* spp.: Ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v.25, n.4, p.341-348, 2004.

BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; MANOEL, A. V.; D'OVÍDIO, L.; SILVA, L. C.; FRANCO, B. D. G. M.; BELOTI, V. *Listeria* spp. associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4. 2007a.

BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; MONTEIRO, A. A.; BELOTI, V. Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.856-862, 2007b.

BARROS, Márcia Aguiar Ferreira. **Listeria monocytogenes: Ocorrência na carne bovina, identificação dos principais pontos de contaminação em plantas de processamento e relação com a microbiota acompanhante**. 2005. 152f. Tese (Doutor em Ciência Animal)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BELL, C. Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.197-216, 2002.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Listeria: a practical approach to the organism and its control**. 2.ed., Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2005. 288 p.

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

BETANCOURT, M. R.; SHACKELFORD, S. D.; ARTHUR, T. M.; WESTMORELAND, K. E.; BELLINGER, G.; ROSSMAN, M.; REAGAN, J. O.; KOOHMARAIE, M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. **Journal of Food Protection**, v.67, n.2, p.295-302, 2004.

BETTELHEIM, K. A.; BEUTIN, L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.205-217, 2003.

BEUCHAT, L.R.; COPELAND, F.; CURIALE, M.S.; DANISAVICH, T.; GANGAR, V.; KING, B.W.; LAWLIS, T.L.; LIKIN, R.O.; OKWUSOA, J. SMITH, C.F.; TOWNSEND, D.E. Comparison of the Simplate total plate count method with Petrifilm, Redigel and conventional pour plate methods for enumerating aerobic microorganisms en foods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.1, p.14-18, 1998.

BOPP, C. A; BRENNER, F. W; WELLS, J. G; STROCKBINE, N. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 9ª ed. Washington: American Society for Microbiology, 2003. Cap. 28, p 459-474.

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.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Harsad identification is swine slaughter with respect foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, p.9-25, 2006.

BORCZYK, A. A.; KARMALI, M. A.; LIOR, H. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet**, v.30, p.98, 1987.

BORTOLUSSI, R. Listeriosis: a primer. **Canadian Medical Association Journal**, v.179, n.8, p.795-797, 2008.

BOSILEVAC, J. M.; ARTHUR, T. M.; BONO, J. L.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; KALCHAYANAND, N.; KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in U.S. abattoirs that process fewer than 1000 head of cattle per day. **Journal of Food Protection**, v.72, p.1272–1278. 2009.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n. 12. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 janeiro 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde- SVS. Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas Por Alimentos. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf> Acesso em: 03 mar 2010.

BREUM, S. O.; BOEL, J. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and verocytotoxin producing *E. coli* (VTEC) on Danish beef carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.90–96, 2010.

BUCHRIESER, C. Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. **Microbes and Infection**, v.9, p.1147-1155, 2007.

CABRITA, P.; CORREIA, S.; FERREIRA-DIAS, S.; BRITO, L. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. **System Applied Microbiology**, n.27, p.454-461, 2004.

CADIRCI, O.; SIRIKEN, B.; INAT, G.; KEVENK, T. O. The prevalence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in ground beef and raw meatball by immunomagnetic separation and the detection of virulence genes using multiplex PCR . **Meat Science**, n.84, p.553–556, 2010.

CAIRNS, B. J.; PAYNE, R. J. H. Sudden increases in listeriosis rates in England and Wales, 2001 and 2003. **Emerging Infectious Diseases**, n.15, p.465-468, 2009.

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; BYRD, J. A.; NISBET, D. J. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. **Journal of Animal Science**, v.86, n.14, p.163-172, 2008.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* among the traditional enteropathogenic *E. coli* groups—a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, n.6, p. 545-552, 2004.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v.36, p.289-311, 2005.

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.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Listeria monocytogenes*. 2010. Disponível em: http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens_pages/listeria_monocytogenes.htm Acesso em: 12 jan. 2011.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Listeriosis. Division of bacterial and mycotic disease. October, 2005. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g.htm Acesso em: 15 jan. 2011.

CEBULA, T. A.; PAYNE, W. L.; FENG, P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.248-250, 1995.

CHAHED, A.; CHINA, B.; MAINIL, J.; DAUBE, G. Prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *Escherichia coli* on bovine carcasses in Algeria. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.361-368, 2006.

CHEN, J.; CHEN, Q.; JIANG, J.; HU, H.; YE, J.; FANG, W. Seroovar 4b complex predominates among *Listeria monocytogenes* isolates from imported aquatic products in China. **Foodborne Pathogens Disease**, n.7, p.31-41, 2010.

CHEN, J.; ZHANG, X.; MEI, L.; JIANG, L.; FANG, W. Prevalence of *Listeria* in Chinese food products from 13 provinces between 2000 and 2007 and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.1, p.7-14, 2009.

CHIARINI, E.; THYLER, K.; FARBER, J. M.; PAGOTTO, F.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes* em two different poultry facilities: manual and automatic evisceration. **Poultry Science**, v.88, n.4, p.791-797, 2009.

CHIARINI, Eb. ***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação**. 2007. 149f. Tese (Doutor em Ciências)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHILDS, K. D.; SIMPSON, C. A.; WARREN-SERNA, W.; BELLENGER, G.; CENTRELLA, A.; BOWLING, R. A.; RUBY, J.; STEFANEK, J.; VOTE, D. J.; CHOAT, T.; SCANGA, J. A.; SOFOS, J. N.; SMITH, G. C.; BELK, K. E. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 hide contamination routes: feedlot to harvest. **Journal of Food Protection**, v.69, n.6, p.1240-1247, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Food Hygiene. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment. Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. CAC/GL 30, 1999.

COLODNER, R.; SAKRAN, W.; MIRON, D.; TEITLER, N.; KHAFALEVSKY, E.; KOPELOWITZ, J. *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a nursery. **American Journal of Infection Control**, v.31, n.5, p.322-324, 2003.

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

COOMBES, B. K.; WICKHAM, M. E.; MASCARENHAS, M.; GRUENHEID, S.; FINALY, B. B.; KARMALI, M. A. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.07, p.2153-2160, 2008.

COSSART, P.; TOLEDO-ARANA, A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. **Microbes and Infection**. v.10, p.1041-1050, 2008.

COSTA, Christiane Asturiano Ristori. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo**. 2010. 127f. Tese (Doutor em Ciências dos Alimentos)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: an infectious agent scarcely known in Brazil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.19, n.2, p.195-206, 2008.

DE TONI, F.; SOUZA, E. M.; KLASSEN, G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, C. R.; PICHETH, G.; FARAH, S. M. S. S.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Detecção de *Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC) através da amplificação dos genes *stx*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.36, n.2, p.73-77, 2004.

DENNIS, S. B.; KAUSE, J.; LOSIKOFF, M.; ENGELJOHN, D. L.; BUCHANAN, R. L. Using risk analysis for microbial food safety regulatory decision making. In: SCHAFFNER, D. W. (Ed.). *Microbial Risk Analysis of Foods*. Washington, 2008. Cap. 5, p.137-176.

DI BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; IANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1552-1561, 2008.

DIAS, Denise de Almeida Marques. **Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no estado de São Paulo**. 2008. 84f. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.3819-3822, 2004.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review of Microbiology**, v.58, p.587-610, 2004.

ERICKSON, M. C.; DOYLE, M. P. Food as vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v.70, n.10, p.2426-2449, 2007.

ETCHEVERRÍA, A. I.; PADOLA, N. L.; SANZ, M. E.; POLIFRON, R.; KRÜGER, A.; PASSUCCI, J.; RODRÍGUEZ, E. M.; TARABORELLI, A. L.; BALLERIO, M.; PARMA, A. E. Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina **Meat Science**, v.86, p.418-421, 2010.

ETHELBERG, S.; SMITH, B.; TORPDAHL, M.; LISBY, M.; BOEL, J.; JENSEN, T.; NIELSEN, E. M.; MØLBAK, K. Outbreak of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p.78–81, 2009.

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

FELIPE, Livia Mara. **Associação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Clostridium estertheticum* com a deterioração “blown pack” em cortes cárneos embalados a vácuo**. 2008. 86f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo.

FENG, P. Identification of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNA probe specific for an allele of *uidA* gene. **Molecular Cellular Probes**, v.7, p.151-154. 1993.

FENG, P.; MONDAY, S. R. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Molecular and Cellular Probes**, v.14, p.333-337, 2000.

FERRONATO, Andréia Inês. **Contaminação de carcaças e ambiente por *Listeria* spp. em diferentes etapas no abate de suínos**. 2010. 65f. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)-Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FILHO, A. T. F.; 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, 2006.

FONTOURA, Christianne Lino. **Estudo microbiológico em carcaças bovinas e influência da refrigeração sobre a microbiota contaminante**. 2006. 64p. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Trad. Maria carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt – Porto Alegre: Artmed, 2002. 216-211p.

FRANÇA, Leonardo. **Listeria spp. e Listeria monocytogenes em carne bovina refrigerada e embalada a vácuo, equipamentos e ambientes de matadouros-frigoríficos**. 2008. 93f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiás.

FRANCO, Bernadette D. G. M; LANDGRAF; Mariza, M. T. D. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2005. 127-171p.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v.30, n.5, p.911-921, 1998.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; TRABULSI, L. R.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G.; MATTHEWS, S. Intimin and the host cell- is it bound to end in Tir(s)? **TRENDS in Microbiology**, v.9, n.5, p.214-218, 2001.

FSA - FOOD STANDARDS AGENCY. **Red Meat Safety & Clean Livestock**. 2002. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/redmeatsafety.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2011.

GANGAR, V.; CURIALE, M.; LINDBERG, K.; GAMBREL-LENARZ, S.G. Dry rehydratable film method for enumerating confirmed *E. coli* in poultry, meats and seafood: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v.82, n.1, p.73-78, 1999.

GARRIDO, P.; BLANCO, M.; MORENO-PAZ, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; STEC-EPEC oligonucleotide *microarray*: A new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. **Clinical Chemistry**, v.52, p.192–201, 2006.

GARVEY, P., MCKEOWN, P., CARROLL, A., MCNAMARA, E. Epidemiology of verotoxigenic *E. coli* in Ireland. **Epi-Insight**, n.10, p.1-5, 2009.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Hygiene and sanitary surveillance of food**. 3.ed. Barueri, São Paulo: Manole. 2008.

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

GILL, C. O. 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, p.118-157, 1998.

GILL, C. O. Visible Contamination on Animals and Carcasses and the Microbiological Condition of meat. **Journal of Food Protection**, v.67, n.2, p.413-419, 2004.

GILL, C. O.; BRYANT, J.; LANDERS, C. Identification of critical control points for control of microbiological contamination in processes leading to the production of ground beef at a packing plant. **Food Microbiology**, v.20, p.641-650, 2003.

GILL, C. O.; JONES, T.; BRYANT, J.; BRERETON, D. A. The microbiological conditions of the carcasses of six species after dressing at a small abattoir. **Food Microbiology**, v.17, p.233-239, 2000.

GILL, C. O.; LANDERS, C. Microbiological conditions of detained beef carcasses before and after removal of visible contamination. **Meat Science**, v.66, p.335-342, 2004.

GOMES-NEVES, E.; CARDOSO, C. S.; ARAÚJO, A. C.; COSTA, J. M. C. Meat handlers training in Portugal: A survey on knowledge and practice. **Food Control**, v.22, p.501-507, 2011.

GOPAL S.; BERG D.; HAGEN N.; SCHRIEFER E. M.; STOLL R.; GOEBEL W.; KREFT J. Maltose and maltodextrin utilization by *Listeria monocytogenes* depend on an inducible ABC transporter which is repressed by glucose. **PLoS One**, v.5, n.4, p.10349-10371, 2010.

GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.; DE VALK, H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.5, p.734-740, 2008.

GRAIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, n.2, p.77- 87, 2009.

GRAVES, L. M.; HELSEL, L. O.; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E.; DANESHVAR, M. I.; ROOF, S. E.; ORSI, R. H.; FORTES, E. D.; MILILLO, S. R.; DENBAKKER, H. C.; WIEDMANN, M.; SWAMI- NATHAN, B.; SAUDERS, B. D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.60, p.1280-1288, 2010.

GUN, H.; YILMAZ, A.; TURKER, S.; TANLASI, A.; YILMAZ, H. Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.339-344, 2003.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, n.85, p.45–62, 2007.

HOLT, J.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 Ed. Baltimore: The Willians e Wilkins Co, 1994, 751p.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I. A.; O'BRIEN, S. J. Foodborne trasnmission of infectious intestinal disease in Englandand Wales, 1992-2003. **Food Control**, v.18, n.7, p.766-772, 2007.

HUNT, J. M. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC). **Clinics in Laboratory Medicine**, v.30, p.21-45, 2010.

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

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

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. **Bacteria Associated With Foodborne Diseases**. Scientific Status Summary. August, 2004.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbial Ecology of Foods Commodities**. 2 ed. New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2005. 736 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO 11.290-1). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes* spp., 1th ed, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO 16654). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. spp. 2001.

IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; VAZ, T. M. I.; RAMOS, I. I.; SOUZA, M. A. C.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.29-36, 2005.

IVANEK, R.; GROHN, Y. T.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.4, p.319-336, 2006.

JALALI, M.; ABEDI, D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v.122, p.336-340, 2008.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.2, n.26, p.277-282, 2006.

JARDIM, F. B. B.; SILVA, E. N.; RAMOS, M. A. Contagem de Microrganismos indicadores em carcaças bovinas no abate. **Fazu em Revista**, n.1, p.11-20, 2004.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiology**, n.27, p.710-730, 2010.

JAY, J. M. Listerioses de origem animal. In **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap.25, p.517-542.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed., New York: Springer. 2005. 790p.

JAY, J. M.; VILAI, J. P.; HUGHES, M. E. Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5-7°C. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.105–111, 2003.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: foodborne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifique et Technique (International office of Epizootics)**, v.25, n.2, p.571- 580, 2006.

JERSE, A. E.; YU, J.; TALL, B. D.; KAPER, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v.87, p.7839-7843, 1990.

JIANG, L.; CHEN, J.; XU, J.; ZHANG, X.; WANG, S.; ZHAO, H.; VONGXAY, K.; FANG, W. Virulence characterization and genotypic analyses of *Listeria monocytogenes* isolates from food and processing environments in eastern China. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.53–59, 2008.

KALAC, P. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. **Food Chemistry**, v.125, p.307–317, 2011.

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

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews – Microbiology**, v.2, p.123-138, 2004.

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

KARMALI, M. V. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, p.15-38, 1989.

KASNOWSKI, Maria Carmela. ***Listeria spp., Escherichia coli: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída***. 2004. 111f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)–Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

KAUFMANN, M.; ZWEIFEL, C.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; BEUTIN, L.; STEPHAN, R. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. **Journal of Food Protection**, v.69, n.2, p.260-266, 2006.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 24, p.107-117, 2000.

KVISTHOLM, J. A.; ETHELBERG, S.; SMITH, B.; MØLLER N. E.; LARSSON, J.; MØLBAK, K.; CHRISTENSEN, J.J.; KEMP, M. Substantial increase in listeriosis, Denmark 2009. *Eurosurveillance* v.15, 2010. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19522>> Acesso em: 18 jan. 2011.

LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.729-745, 2000.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P.; LE FLÈCHE-MATÉOS, A.; ROCHE, S. M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F.; *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. (2009), doi:10.1099/ijs.0.017376-0

LENAHAN, M.; O'BRIEN, S.; KINSELLA, K.; SWEENEY, T.; SHERIDAN, J. J. Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 on Irish lamb carcasses, fleece and in faeces samples. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2401–2409. 2007.

LI, Q.; SHERWOOD, J. S.; LOGUE, C. M. The prevalence of *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 on bison carcasses during processing. **Food Microbiology**, v.21, p.791–799, 2004.

LIANOU, A.; STOPFORTH, J. D.; YOON, Y.; WIEDMANN, M.; SOFOS, J. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. **Journal of Food Protection**, v.69, n.11, p.2640-2647, 2006.

LIMA, A. S.; VON LAER, A. E.; TRINDADE, P. S.; PADILHA, W.P. Disseminação de *Listeria monocytogenes* no processamento de lingüiça mista frescal avaliada por sorologia E RAPD. **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v.16, n.3, p. 245-251, 2005.

LOMONACO, S.; DECASTELLI, L.; NUCERA, D.; GALLINA, S.; BIANCHI, D. M.; CIVERA, T. *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.516–520, 2009.

LÓPEZ, V.; VILLATORO, D.; ORTIZ, S.; LÓPEZ, P.; NAVAS, J.; DÁVILA, J. C.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. **Meat Science**. v.78, p.130-134, 2008.

LUCK, S. N.; BENNETT-WOOD, V.; POON, R.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.73, n.5, p.3063-3071, 2005.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, 18 humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1332-1344. 2005.

MANNING, S. D.; MADERA, R.T.; SCHNEIDER, W.; DIETRICH, S.E.; KHALIFE, W.; BROWN, W.; WHITTAM, T. S.; SOMSEL, P.; RUDRICK, J.T.; Surveillance for Shiga-toxin producing *Escherichia coli*, Michigan, 2001-2005. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.2, p.318–321, 2007.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em Alimentos de Origem Animal. **Revista da FZVA**, v.14, n.1, p.180-192, 2007.

MARTINS, E. A.; GERMANO, P. M. L. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, n.22, p.297-302, 2011.

MAURER, C.; LAZZIERA, C.; MADEC, J. Y. Characterization of inducible *stx*₂-positive *Escherichia coli* O157:H7/H- strains isolated from cattle in France. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1569-1576, 2008.

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 Infectious Diseases**, v.5, n.5, p.607-625, 1999.

MELONI, D.; GALLUZZO, P.; MUREDDU, A.; PIRAS, F.; GRIFFITHS, M.; MAZZETTE, R. *Listeria monocytogenes* in RTE foods marketed in Italy: prevalence and automated *EcoRI* ribotyping of the isolates. **International Journal of Food Microbiology**, n.129, p.166-173, 2009.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. Molecular typing and differentiation. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. ed. **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Cap. 35, p.331-341.

MENGESHA, D., ZEWEDE, B. M., TOQUIN, M. T., KLEER, J., HILDEBRANDT, G., GEBREYES, W. A. Occurrence and distribution of *Listeria monocytogenes* and other

Listeria species in ready-to-eat and raw meat products. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.122, p.20-24, 2009.

MESQUITA, M. O.; DANIEL, A. P.; SACCOL, A. L. F.; MILANI, L. I. G.; FRIES, L. L. M. Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, 2006.

MILNES, A. S.; STEWART, I.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; DAVIES, R. H.; NEWELL, D. G.; SAYERS, A. R.; CHEASTY, T.; CASSAR, C.; RIDLEY, A.; COOK, A. J.; EVANS, S. J.; TEALE, C. J.; SMITH, R. P.; MCNALLY, A.; TOSZEGHY, M.; FUTTER, R.; KAY, A.; PAIBA, G. A. Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. **Epidemiology and Infection**, v.136, p.739–751. 2008.

MOHAMMED, H. O.; STIPETIC, K.; MCDONOUGH, P. L.; GONZALEZ, R. N.; NYDAM, D. V.; ATWILL, E. R. Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, n.70, p.383–388, 2009.

MORAN, L.; SCATES, P.; MADDEN, R. H. Prevalence of *Campylobacter* spp. in raw retail poultry on sale in Northern Ireland. **Journal of Food Protection**, n.72, p.1830-1835, 2009.

MOXLEY, R. A.; SMITH, D. R. Attaching-effacing *Escherichia coli* Infections in Cattle. **Veterinary Clinics of Food Animal**, v.26, n.1, p.29-56, 2010.

MÜRMANN, L.; SANTOS, M. C.; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.529-534, 2008.

NALÉRIO, É. S.; ARAÚJO, M. R.; MENDONÇA, K. S.; BASSANI, M. T.; SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, 2009.

NATARO, J.; KAPER, J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiological Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NERO, L. A.; RODRIGUES, L. D.; VICOSA, G. N.; ORTOLANI, M. B. T. Performance of petrifilm aerobic count plates on enumeration of lactic acid bacteria in fermented milks. **Journal of Rapid Methods Automation in Microbiology**, n.16, p.132-139, 2008.

NIGHTINGALE, K. K.; WINDHAM, K.; WIEDMANN, M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and food. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.5537-5551, 2005.

NYACHUBA, D. G.; DONNELLY, C. W. Comparison of 3M (TM) Petrifilm (TM) environmental *Listeria* plates against standard enrichment methods for the detection of *Listeria monocytogenes* of epidemiological significance from environmental surfaces. **Journal Food Science**, n.72, p.346-354, 2007.

OLIVEIRA, K. A. M.; VIEIRA, E. N. R. **Microbiologia de Alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo**. Viçosa: UFV, 2003.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.41, p.97-106, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; MENDONÇA, A. T.; PICCOLI, R. H. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.6, 2008.

ORDEN, J. A.; CORTE´S, C.; HORCAJO, P.; DE LA FUENTE, R.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; LO´PEZ, C.; BLANCO, J.; CONTRERAS, A.; SANCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; DOMINGUEZ-BERNAL, G. A longitudinal study of verotoxin-producing *Escherichia coli* in two dairy goat herds. **Veterinary Microbiology**, n.132, p.428-434, 2008.

ORSI, R. H.; BAKKER, H.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal of Medical Microbiology**, n.21, p.76-96, 2011.

OSAILI, T. M.; ALABOUDI, A. R; NESIAR, E. A. Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. **Food Control**, n.22, p.586-590, 2011.

PAIBA, G. A.; WILESMITH, J. W; EVANS, S. J.; PASCOE, S. J.; SMITH, R. P.; KIDD, S. A.; RYAN, J. B.; MCLAREN, I. M.; CHAPPELL, S. A.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; FRENCH, N. P.; JONES, T. W.; BUCHANAN, H. F.; CHALLONER, D. J.; COLLOFF, A. D.; CRANWELL, M. P.; DANIEL, R. G.; DAVIES, I. H.; DUFF, J.P.; HOGG, R. A.; KIRBY, F. D.; MILLAR, M. F.; MONIES, R. J.; NICHOLLS, M. J.; PAYNE, J. H. Prevalence of faecal excretion of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in cattle in England and Wales. **The Veterinary Record**, v.153, p.347-353, 2003.

PAINTER, J.; SLUTSKER, L. **Listeria, listeriosis and food safety**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, cap 4, 2007. 85-109p.

PARDI, C. M; SANTOS, I. F; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. Goiânia: Eduff, 2006. 624p.

PATON, A. W.; WOODROW, M. C.; DOYLE, R. M.; LANSER, J. A.; PATON, J. C. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.10, p.3357-3361, 1999.

PERELLE, S.; DILASSER, F.; GROUT, J.; FACH, P. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.284-288, 2007.

PERRIN, M.; BEMER, M.; DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.11, p.5308-5309, 2003.

PETERSON, R. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; MOXLEY, R. A.; ERICKSON, G. E.; HINKLEY, S.; BRETSCHEIDER, G.; BERBEROV, E. M.; ROGAN, D.; SMITH, D. R. Effect of a vaccine product containing type III secreted proteins on the probability of *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and mucosal colonization in feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, v.70, n.11, p.2568-2577, 2007.

PHILLIPS, D.; SUMNER, J.; ALEXANDER, J.; DUTTON, K. Microbiological quality of Australian beef. **Journal of Food Protection**, v.64, p.692-696, 2001.

PIÉRARD, D.; Van DAMME, L.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4585-4587, 1997.

PIGATTO, Camila Barbieri. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) isoladas de bovinos de corte do estado do Paraná**. 2008. 98f. Tese (Doutor em Medicina Veterinária) -Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

PINTO, Maximiliano Soares. **Efeito da microbota endógena e da nisina sobre *Listeria spp.* e *Staphylococcus aureus* em queijo minas artesanal do Serro**. 2008. 71f. Tese (*Doctor Scientiae*)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PRADEL, N.; BERTIN, Y.; MARTIN, C.; LIVRELLI, V. Molecular analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. **Applied and Environmental Microbiology**, n.74, p.2118–2128, 2008.

PRATA, Camila Barbieri. **Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em bovinos abatidos em estabelecimento habilitado à exportação na cidade de Barretos – SP, Brasil**. 2009. 89f. **Dissertação** (Mestre em Microbiologia Agropecuária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

PRENDERGAST, D. M.; LENDRUM, L.; PEARCE, R.; BALL, C.; MCLERNON, J.; O'GRADY, D.; SCOTT, L.; FANNING, S.; EGAN, J.; GUTIERREZ, M. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in beef and sheep abattoirs in Ireland and characterisation of isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis. **International Journal of Food Microbiology**, n.4, p.519–527, 2011.

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

RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V. M.; REJITHA, J. S.; LEKSHMI, M. U.; DHARSANA, K. S.; PRASAD, S. P.; VIJILA, H. M. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.40, p.4-13, 2007.

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**, n.11, p.603-609. 2005.

RATNAM, S.; MARCH, S. B.; AHMED, R.; BEZANSON, G. S.; KASATYA, S. Characterization of *Escherichia coli* Serotype O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, p.2006-2012, 1988.

RHOADES, J. R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enteric* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. **Food Microbiology**, v.26, n.4, p.357-376, 2009.

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

RIGOBELLO, E. C.; STELLA, A. E.; ÁVILA, F. A.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.110, p.194-198, 2006.

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

ROÇA, R. O. **Microbiologia da carne**. UNESP, Campus de Botucatu, 2004. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/tecarne.htm#s5>> Acesso em: 10 jan. 2011.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C.; **Listeria, listeriosis and food safety**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, cap 1, 2007.1-20p.

RUSSELL, M.S. Comparison of the Traditional Three Most Probable Number method with the Petrifilm, Simplate, Biosys Optical and Bactometer Conductance methods for enumerating *E. coli* from chicken carcasses and ground beef. **Journal of Food Protection**, v.63, n.9, p.1.179-1.183, 2000.

SABA, R. Z.; BURGUER, K. P.; ROSSI, O. D. Pressão e temperatura da água de lavagem na população microbiana da superfície de carcaças bovinas. **Ciência Rural**, v.40, n.9, 2010.

SAITON, T.; IYODA, S.; YAMAMOTO, S.; LU, Y.; SHIMUTA, K.; OHNISHI, M.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H. Transcription of the ehx Enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.14, p.4822-4830, 2009.

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

SANCHEZ, S.; MARTINEZ, R.; ALONSO, J. M.; REY J. Aspectos clínicos y patogénicos de las infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 y otros *E. coli* verotoxigénicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.28, n.6, p.370-374, 2010a.

SANCHEZ, S.; MARTINEZ, R.; GARCIA, A.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; LOPEZ, C.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J. M. Longitudinal study of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding in sheep feces: persistence of specific clones in sheep flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, n.75, p.1769-1773, 2009.

SANCHEZ, S.; MARTINEZ, R.; GARCIA, A.; VIDAL, D.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; HERRERA-LEON, S.; ECHEITA, A.; ALONSO, J.M.; REY, J. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. **Veterinary Microbiology**, n.143, p.420–423, 2010b.

SANTANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M. Avaliação quantitativa de risco microbiológico em alimentos: conceitos, sistemática e aplicações. **Brazilian Journal Food Technology**, v.12, n.4, p.266-276, 2009.

SANTOS, Loreane Ana Guimarães. **Listeria monocytogenes em suínos abatidos: Subsídio sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle-APPCC**. 2003. 48f. Tese (*Magister Scientiae*)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SARTZ, L.; DE JONG, B.; HJERTQVIST, M.; PLYM-FORSHELL, L.; ALSTERLUND, R.; LÖFDAHL, S.; OSTERMAN, B.; STÅHL, A.; ERIKSSON, E.; HANSSON, H. B.; KARPMAN, D. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. **Epidemiology and Infection**, v.136, p.370–380. 2008.

SASAKI, Y.; TSUJIYAMA, Y.; KUSUKAWA, M.; KATAYAMA, M. M. S.; YAMADA, Y. Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 in Beef Farms, **Veterinary Microbiology**. (2010), doi:10.1016/j.vetmic.2010.12.024

SAUDERS, B. D.; SANCHEZ, M. D.; RICE, D. H.; CORBY, J.; STICH, S.; FORTES, E. D.; ROOF, S. E.; WIED-MANN, M. Prevalence and molecular diversity of *Listeria monocytogenes* in retail establishments. **Journal Food Protection**, v.72, p.2337-2349, 2009.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; REIS, R. A.; COAN, R. M.; BERNARDES, T. F.; PANIZZI, R. C.; POIATTI, M. L.; PEDREIRA, M. S. Alterações Químicas e Microbiológicas nas Silagens de Capim-Tifton 85 após a Abertura dos Silos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.464-471, 2005.

SCHWACH, Erich. **Validação do sistema de monitoramento para redução da contaminação microbiana em carcaças bovinas**. 2007. 67f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SILAGYI, K.; KIM, S-H.; LO, Y. M.; WEI, C. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. **Food Microbiology**, v.26, p.514-519, 2009.

SILVA JUNIOR, E. S. **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. 4.ed. São Paulo: Varela, 2001.

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

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

SOFOS, J. N. Biofilms: Our constant enemies. **Food Safety Magazine**, v.38, p.40-41, 2009.

SOFOS, J. N.; GEORNARAS, I. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. **Meat Science**, n.86, p.2-14, 2010.

STELLA, A. E.; RIGOLBELO, E. C.; OLIVEIRA, A. C.; MALUTA, R. P.; MARIN, J. M.; ÁVILA, F. V. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *E. coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.1, p.66-74, 2008.

STEPHAN, R.; RAGETTLI, S.; UNTERMANN, F. Prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.335-341, 2000.

STRACHAN, N. J. C.; DUNN, G. M.; LOCKING, M. E.; REID, T. M. S.; OGDEN, I. D. *Escherichia coli* O157: Burger bug or environmental pathogen? **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p.129-137, 2006.

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, n.3, p.1116-1122, 1988.

SUMNER, J.; PETRENAS, E.; DEAN, P.; DOWSETT, P.; WEST, G.; WIERING, R.; RAVEN, G. Microbial contamination on beef and sheep carcasses in South Australia. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.255-260, 2003.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. Mili- Um meio para realização dos Testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Revista de Microbiologia**. v.13, n.3, p.230-235, 1982a.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. EPM-modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, uréase e triptofano desaminase. **Revista de Microbiologia**. v.13, n.4, p.309-315, 1982b.

TORRES, K.; SIERRA, S.; POUTOU, R.; CARRASCAL, A.; MERCADO, M. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. **MVZ-Córdoba**, v.10, n.1, p.511-543, 2005.

TRISTÃO, L. C. S.; GONZALEZ, A. G. M.; COUTINHO, C. A. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; GOMES, M. J. P.; IRINO, K.; GUTH, B. E. C.; ANDRADE, J. R. C. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. **Veterinary Microbiology**, v.119, p.358-365, 2007.

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

UHITIL, S.; JAKSIC, S.; PETRAK, T.; MEDIC, H.; GUMHALTER-KAROLYI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. **Food Control**, v.15, n.3, p.213-216, 2004.

USDA - United States Department of Agriculture. 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, 1996.

VAILLANT, V.; DE VALK, H.; BARON, E.; ANCELLE, T.; COLIN, P.; DELMAS, M. C.; DUFOUR, B.; POUILLLOT, R.; LE STRAT, Y.; WEINBRECK, P.; JOUGLA, E.; DESENCLOS, J. C. Foodborne infections in France. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.2, p.221-232, 2005.

VANSELOW, B. A.; KRAUSE, D. O.; MCSWEENEY, C. S. The Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, their ruminant hosts, and potential on-farm interventions: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.56, p.219–244, 2005.

VARELA-HERNÁNDEZ, J. J.; CABRERA-DIAZ, E.; CARDONA-LÓPEZ, M. A.; IBARRA-VELÁSQUEZ, L. M.; RANGEL-LILLALOBOS, I. I.; CASTILLO, A.; TORRES-VITELA, M. R.; RAMIREZ-ÁLVAREZ, A. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.237-241, 2007.

VASILEV, V.; JAPHETH, R.; ANDORN, N.; YSHAI, R.; AGMON, V.; GAZIT, E.; KASHI, Y.; COHEN, D. A survey of laboratory-confirmed isolates of invasive listeriosis in Israel, 1997-2007. **Epidemiology and Infection**, v.137, n.4, p.577-580, 2009.

VASQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DORNINIQUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology**, v.14, p.584-640, 2001.

VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; NISHIMURA, L. S.; CERGOLE-NOVELLA, M. C.; GUTH, B. E. C. Genetic heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in São Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.3, p.798-804, 2006.

VECCHIA, J. D.; GANDRA, T. K. V.; OLIVEIRA, M. G.; PRATES, D. F.; SILVA, W. P. Ocorrência de *Listeria* spp. no ambiente de processamento e cortes de carne bovina. Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica e XII Encontro de Pós-graduação. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2010.

VICENTE, H. I. G.; AMARAL, L. A.; CERQUEIRA, A. M. F. Shigatoxigenic *Escherichia coli* serogroups O157, O11 and O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.217-222, 2005.

VON LAER, A. E.; LIMA, A. S.; TRINDADE, P. S.; ANDRIGUETTO, C.; DESTRO, M. T.; SILVA, W. P. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.3, p.574-582, 2009.

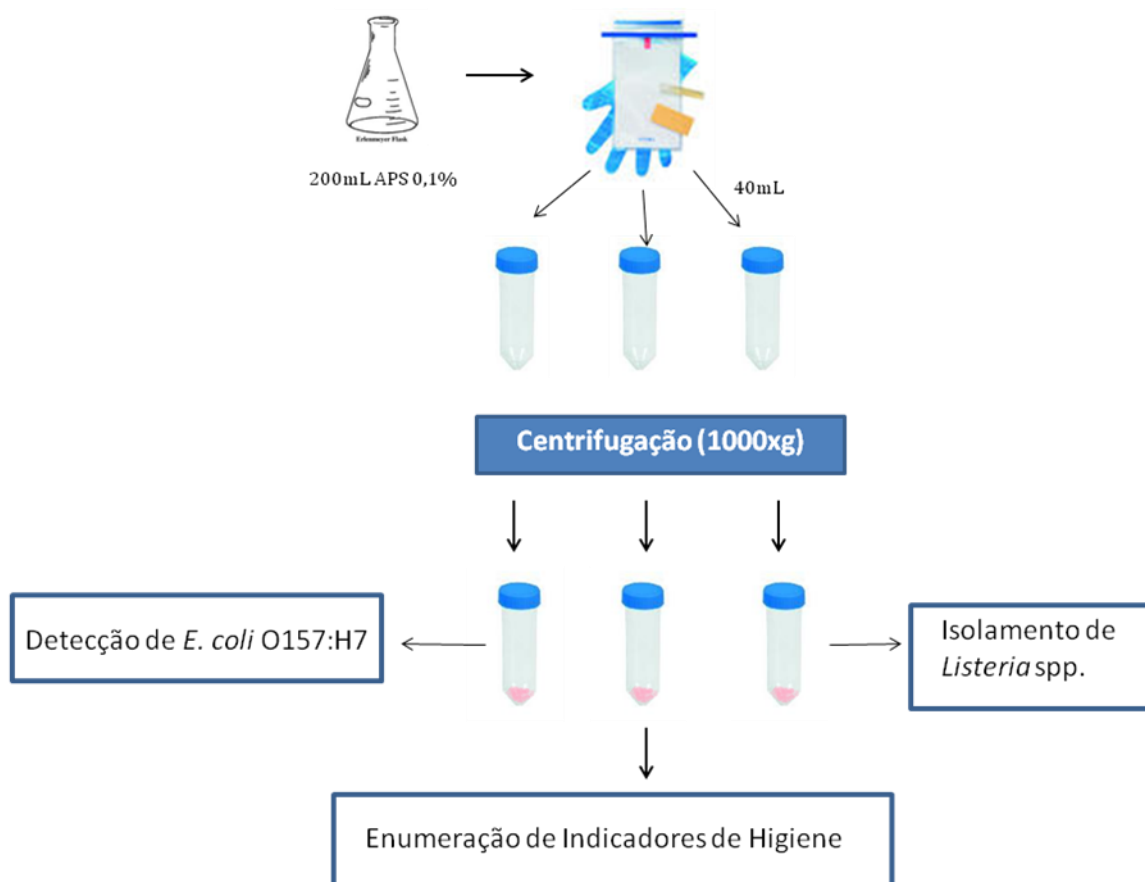
WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Biosciences**, v.8, n.1, p.44-48, 2010.

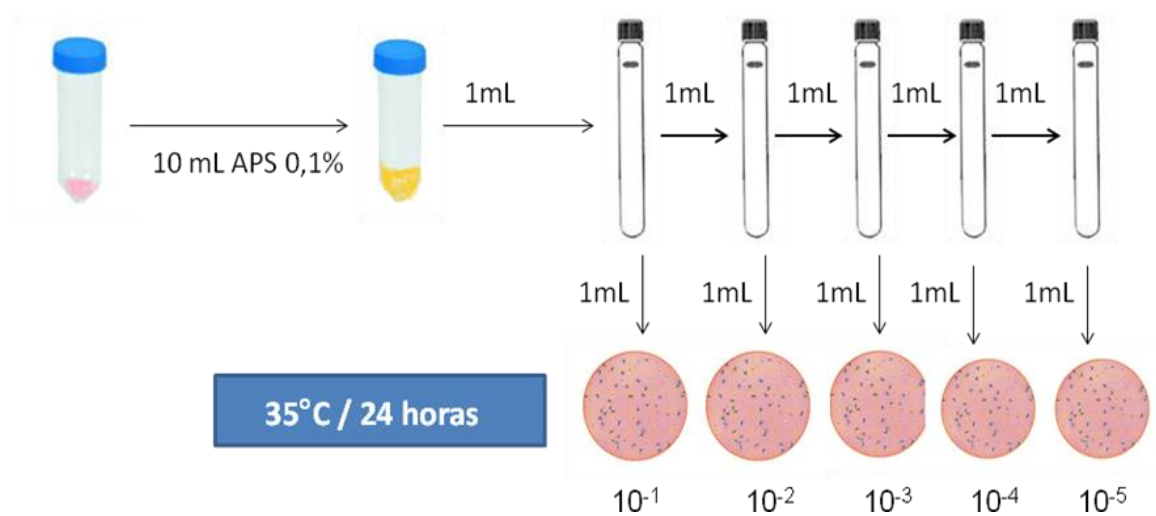
WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. Using risk assessment principles in an emerging paradigm for controlling the microbial safety of foods. In: SCHAFFNER, D. W. (Ed.). **Microbial Risk Analysis of Foods**. Washington, DC, 2008. Cap.2, p.29-50.

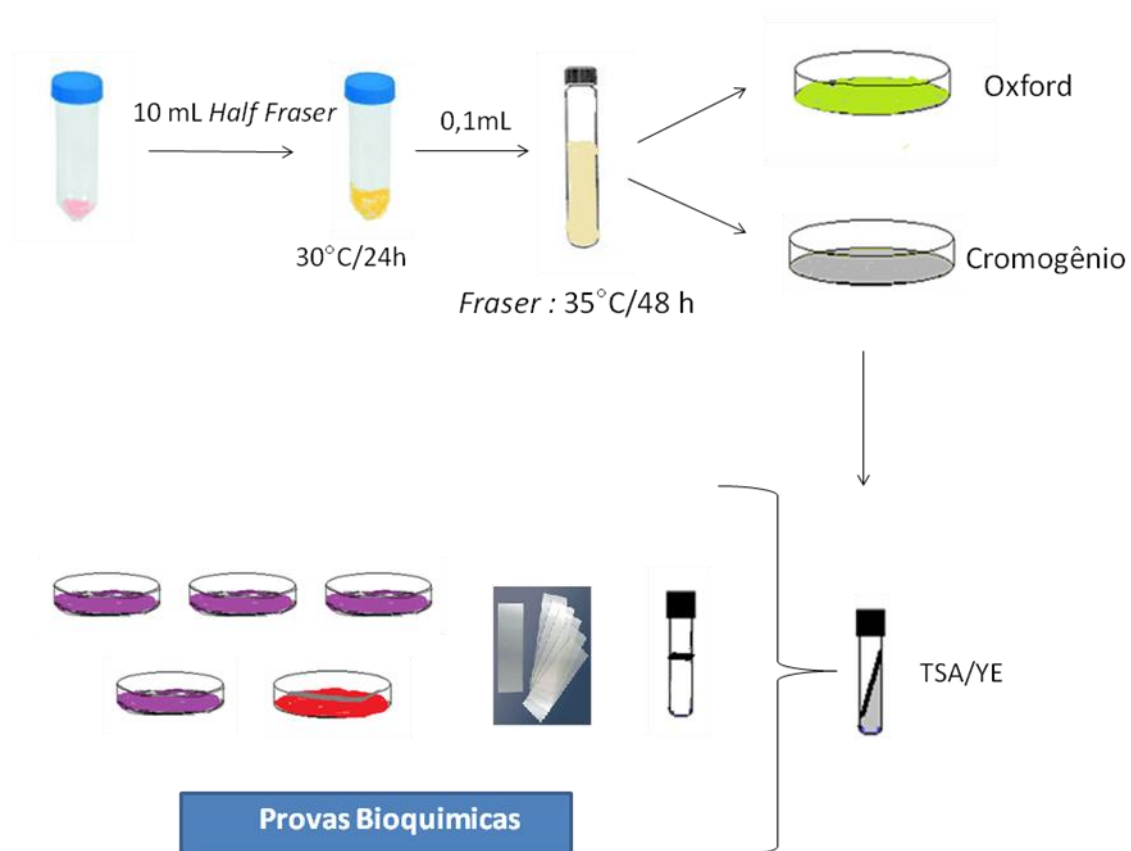
YILMAZ, A.; GUN, H.; UGUR, M.; TURAN, N.; YILMAZ, H. Detection and frequency of VT1, VT2 and *eaeA* genes in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from cattle, cattle carcasses and abattoir environment in Istanbul. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.213-217, 2006.

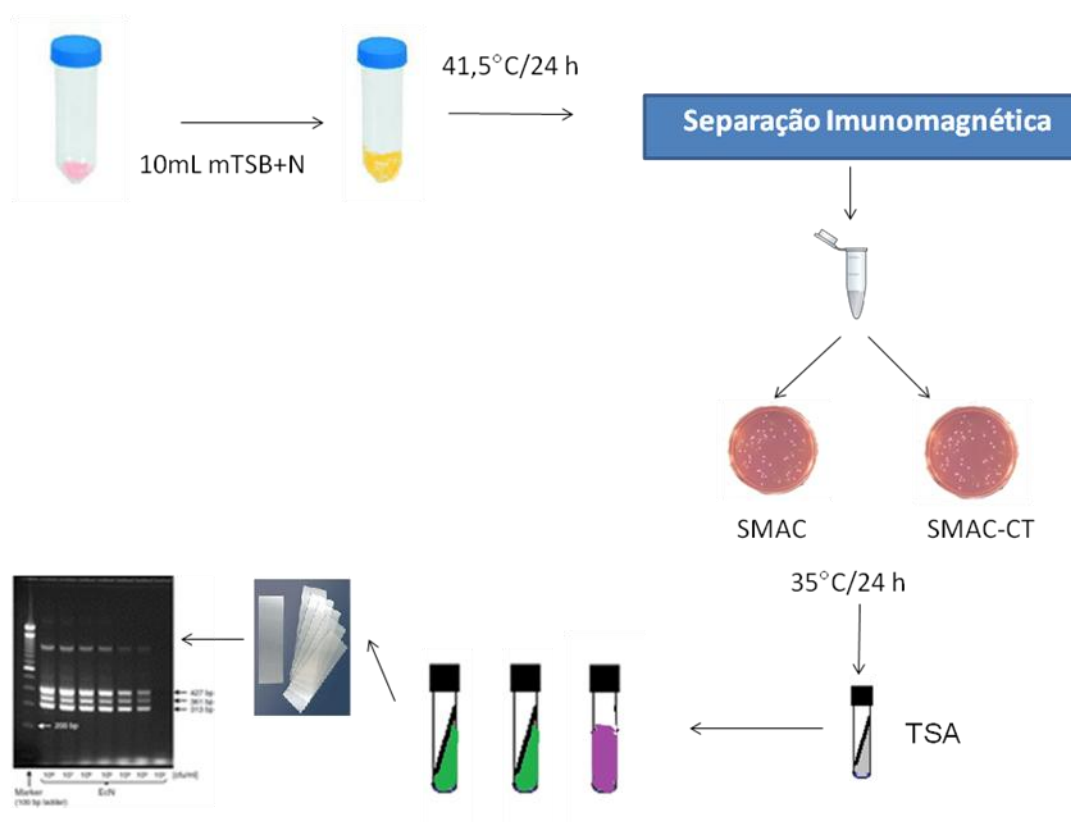
ZAKI, M. E. S.; EL-ADROSY, H. Diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infection, contribution of genetic amplification technique. **Microbes and Infections**, v.9, p.200-203, 2007.

APÊNDICES

Apêndice A: Tratamento inicial das amostras de carcaças bovinas.

Apêndice B: Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene

Apêndice C: Pesquisa de *Listeria* spp.

Apêndice D: Detecção de *E. coli* O157:H7

Anexo

Anexo A: Informações sobre as carcaças bovinas amostradas nos Frigoríficos

Data Coleta	Animal (ID)	Lote	Sexo	Procedência (Município)
05/04/2010	01*	2	M	Rio Grande
05/04/2010	02*	2	M	Rio Grande
05/04/2010	03*	3	F	Jaguarão
05/04/2010	04*	3	F	Jaguarão
05/04/2010	05*	3	F	Jaguarão
27/04/2010	06*	1	M	D. Pedrito
27/04/2010	07*	1	M	D. Pedrito
27/04/2010	08*	1	M	D. Pedrito
27/04/2010	09*	1	M	D. Pedrito
27/04/2010	10*	1	M	D. Pedrito
27/04/2010	11*	1	M	D. Pedrito
27/04/2010	12*	1	M	D. Pedrito
27/04/2010	13*	1	M	D. Pedrito
18/05/2010	14*	1	F	Rio Grande
18/05/2010	15*	1	F	Rio Grande
18/05/2010	16*	1	F	Rio Grande
18/05/2010	17*	1	F	Rio Grande
18/05/2010	18*	1	F	Rio Grande
18/05/2010	19*	1	F	Rio Grande
09/06/2010	20**	1	M	Rio Grande
09/06/2010	21**	1	M	Rio Grande
09/06/2010	22**	1	M	Rio Grande
09/06/2010	23**	1	M	Rio Grande
09/06/2010	24**	1	M	Rio Grande
29/06/2010	25*	1	M	Pedro Osório
29/06/2010	26*	1	M	Pedro Osório
29/06/2010	27*	1	M	Pedro Osório
29/06/2010	28*	1	M	Pedro Osório
29/06/2010	29*	1	M	Pedro Osório
29/06/2010	30*	1	M	Pedro Osório
29/06/2010	31*	1	M	Pedro Osório
04/08/2010	32**	2	M	Santa Vitória
04/08/2010	33**	2	M	Santa Vitória
04/08/2010	34**	2	M	Santa Vitória
04/08/2010	35**	2	M	Santa Vitória
04/08/2010	36**	2	M	Santa Vitória
04/08/2010	37**	2	M	Santa Vitória
04/08/2010	38**	3	F	São Gabriel
05/10/2010	39*	1	M	Arroio Grande
05/10/2010	40*	1	M	Arroio Grande
05/10/2010	41*	1	M	Arroio Grande
05/10/2010	42*	1	M	Arroio Grande
24/11/2010	43**	2	M	Santa Maria
24/11/2010	44**	2	M	Santa Maria
24/11/2010	45**	2	M	Santa Maria

24/11/2010	46**	3	M	Santa Vitória
24/11/2010	47**	3	M	Santa Vitória
24/11/2010	48**	3	M	Santa Vitória
24/11/2010	49**	3	M	Santa Vitória
24/11/2010	50**	3	M	Santa Vitória
24/11/2010	51**	3	M	Santa Vitória
24/11/2010	52**	3	M	Santa Vitória
11/01/2011	53*	7	F	Santa Vitória
11/01/2011	54*	7	F	Santa Vitória
11/01/2011	55*	7	F	Santa Vitória
11/01/2011	56*	7	F	Santa Vitória
11/01/2011	57*	7	F	Santa Vitória
11/01/2011	58*	7	F	Santa Vitória
11/01/2011	59*	8	F	Santa Vitória
11/01/2011	60*	8	F	Santa Vitória

** Carcaças amostradas no Frigorífico A

* Carcaças amostradas no Frigorífico B