

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

Cristhiane Stecanella de Oliveira Cattani

**INFLUÊNCIA DO ÁCIDO LÁTICO E ÁGUA QUENTE COMO
MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM
CARCAÇAS SUÍNAS**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Cleide Rosana Werneck Vieira PhD.

Florianópolis
2012

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Tatiana Rossi - CRB
14/1186

C368i

Cattani, Cristhiane Stecanella de Oliveira,
Influência do ácido lático e água quente como métodos de
descontaminação microbiana em carcaças suínas / Cristhiane
Stecanella de Oliveira Cattani. -- Florianópolis, 2012.

113 p. : il. algumas color., tab. ; 21 cm.

Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-
Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Ácido lático. 2. Água quente. 3. Carcaças suínas. 4.
Descontaminação. I. Universidade Federal de Santa Catarina.
II. Título.

CDD: 636.4

CDU: 636.4

Cristhiane Stecanella de Oliveira Cattani

**INFLUÊNCIA DO ÁCIDO LÁTICO E ÁGUA QUENTE COMO
MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM
CARCAÇAS SUÍNAS**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos e aprovado em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 07 de dezembro de 2012.

Profa. Roseane Fett, Dra.
Coordenadora do curso

Banca Examinadora:

Profa. Cleide Rosana Werneck Vieira, Ph.D.
Orientadora - Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Leadir Lucy Martins Fries, Dra.
Membro externo - Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Paulo Rogerio Franchin, Dr.
Membro externo - Universidade do Oeste de Santa Catarina

Prof. Heitor Daguer, Dr.
Membro externo - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Prof. César Damian, Dr.
Membro interno - Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a minha família e em especial aos meus avós Sebastião (in Memoriam) e Gonçala de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por possibilitar e apoiar a realização desta etapa de minha formação profissional, em especial aos amigos da Superintendência Federal de Santa Catarina, Renato Gerszevski e Francisco A. Powell Van de Castelee.

Aos amigos e colegas de trabalho: Antônio Rotta, Leonardo Muliterno e Marcelo Teixeira, vocês foram fundamentais para a execução desse projeto.

À Cooperativa Central Oeste Catarinense, pela importante parceria de trabalho, especialmente à Rodicler Bortolucci e toda a sua equipe, pelo inestimável auxílio prestado em todas as etapas do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e a PURAC do Brasil, pelo apoio financeiro a este projeto.

À minha orientadora, professora Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira, um agradecimento especial por aceitar a orientação deste trabalho, pelos ensinamentos, pela amizade e por me receber no programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

A minhas amigas do laboratório de microbiologia de alimentos da UFSC, por todas as experiências que vivemos juntas nesses últimos anos. Os momentos que passamos jamais serão esquecidos.

Ao Professor Dr. Paulo José Ogliari pela paciência e ajuda nas análises estatísticas.

Ao Sergio Souza pela amizade e apoio burocrático.

A todos os funcionários do NUMICAL, em especial ao amigo e competente profissional Pedro Ivo Pinheiro Fucks que me auxiliou em todas as análises, sem medir esforços.

Aos meus amigos e a minha família, em especial meu esposo Ari e meu filho Guilherme, sempre presentes em todos os momentos dessa longa caminhada.

A Deus e a vida.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a aplicação de água quente entre 76°C e 78°C e ácido láctico a 1,5% na superfície de carcaças suínas visando a redução microbiana. Foram utilizados quatro tratamentos, T1, T2, T3 e T4 com água a diferentes temperaturas seguidos ou não de aspersão de ácido láctico. Foram utilizados e comparados métodos diagnósticos microbiológicos alternativos e convencional para a detecção dos micro-organismos. Foram realizados swabs em carcaças suínas naturalmente contaminadas, durante o processo normal de abate, em um abatedouro sob Inspeção Federal no Estado de Santa Catarina, e pesquisados os micro-organismos mesófilos aeróbios, enterobactérias, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157 pela metodologia convencional, e alternativas pelo PETRIFILM™ e TEMPO®. Não houve resultados positivos para *E. coli* O157. A *Salmonella* spp. foi detectada em 5 (6,58%) das 76 carcaças amostradas, e os sorotipos encontrados foram Thyphimurium, Agona e Derby. O tratamento que demonstrou melhor redução no número de carcaças contaminadas foi o tratamento que consistiu em banhar as carcaças com água com temperatura entre 76°C e 78°C seguido de aspersão de ácido láctico na concentração de 1,5%. O coeficiente de correlação de Pearson demonstrou correlações positivas (0,67 a 0,83) entre as metodologias utilizadas para a contagem de enterobactérias e micro-organismos mesófilos, porém não demonstrou uma boa correlação para o diagnóstico de *E. coli* (0,39). O uso dos métodos alternativos testados em substituição a metodologia convencional pode ser recomendada para diagnóstico de enterobactérias e micro-organismos mesófilos por haver concordância entre os resultados encontrados acrescido da rapidez dessas metodologias.

Palavras-chave: Ácido láctico. Água quente. Carcaças suínas. Descontaminação.

ABSTRACT

This study aimed to analyse hot water between 76°C and 78°C, 1,5% lactic acid on the surface of pig carcasses in order to reduce microbial contamination. For this, was used four treatments, T1,T2,T3 and T4 with water in diferents temperatures, followed or not by lactic acid. For microbiological diagnostic was used alternative and conventional diagnostic methods. Swabs were performed on naturally contaminated pigs carcasses during the normal process of slaughter in line at an abattoir under Federal Inspection, in the State of Santa Catarina, Brazil, and searched mesophilic aerobic micro-organisms, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Salmonella* spp. and *E. coli* O157 from the conventional method and alternative PETRIFILM™ and TEMPO®. There were no positive results for *E. coli* O157. *Salmonella* spp. was detected in 5 (6,58%) from 76 carcasses and the serotype founded was Thyphimurium, Agona e Derby. The treatment that best shows results in reduced the number of contaminated carcasses was that with hot water between 76°C e 78°C followed by spraying of 1,5% lactic acid. The Pearson correlation coefficient showed positive correlation (0,67 a 0,83) between the methodologies used for the enumeration of *Enterobacteriaceae* and mesophilic micro-organisms, but did not show a positive correlation for the diagnosis of *E. coli* (0,39). The use of alternative methods to replace the conventional method can be recommended for diagnosis of Enterobacteriaceae and mesophilic micro-organisms, because there was consistency between the results and the speed was increased by the alternative methodologies.

Keywords: Lactic acid. Hot water. Pig carcasses. Decontamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Participação do Brasil no mercado mundial de exportação de carne suína no ano de 2000 e no ano de 2009	24
Figura 2 - Pocilgas do abatedouro frigorífico onde os suínos permanecem em jejum e dieta hídrica antes do abate	26
Figura 3 - Fluxograma dos procedimentos de abate de suínos.....	28
Figura 4 - Operação de flambagem na área suja do abate de suínos.....	30
Figura 5 - Inspeção post-mortem de intestino de suínos com corte dos linfonodos mesentéricos.....	31
Figura 6 - Chuveiro de lavagem de carcaças de suínos localizado no final da área limpa do abate.....	33
Figura 7 - Estereofomas do ácido láctico.....	49
Figura 8 - Sistema Petrifilm TM com meio de cultura desidratado com agente geleificante e filme superior transparente removível.....	55
Figura 9 - Transferência do inóculo para os cartões do sistema TEMPO®	58
Figura 10 - Fluorescência emitida após clivagem do MUG no Sistema TEMPO®	60
Figura 11 - Captura do antígeno presente na amostra; o Ac se liga ao Ag; um segundo anticorpo conjugado a uma enzima forma o imunocomplexo; A adição de um substrato fluorescente o 4MUP facilita a visualização do antígeno alvo e formação da umbeliferona; leitura d 62	
Figura 12 - Fluxograma das etapas utilizadas na metodologia do sistema Vidas® (Biomérieux S.A.) para detecção de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em carcaças suínas	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência de carcaças suínas detectadas positivas para <i>Salmonella</i> spp. , <i>E. coli</i> e Enterobactérias, analisadas antes e após a aplicação dos tratamentos com água e ácido lático a 1,5% (T0,T1,T2,T3).....	66
Tabela 2 - Média de contagem de micro-organismos Mesófilos aeróbios, enterobactérias, <i>E. coli</i> , inicial (antes do tratamento), final (depois do tratamento) e a redução alcançada após a aplicação dos tratamentos para descontaminação de carcaças suínas.....	67
Tabela 3 - Coeficiente de correlação (r) entre as diferentes metodologias (Convencional, Petrifilm TM e Tempo [®]) na contagem de micro-organismos mesófilos, enterobactérias e <i>E. coli</i> da superfície de carcaças suínas no período de março de 2010 a março de 2011	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	CARNE SUÍNA BRASILEIRA	23
2.1	PRODUÇÃO PRIMÁRIA DE SUÍNOS	24
2.2	PROCESSO DE ABATE DE SUÍNOS	25
2.2.1	Manejo pré-abate	25
2.2.2	Abate	27
2.2.3	Operações da área suja	28
2.2.4	Operações da área limpa	30
2.2.4.1	Procedimentos de inspeção <i>post mortem</i>	30
2.3	MICROBIOTA DOS SUÍNOS.....	33
2.4	MICRO-ORGANISMOS INDICADORES.....	35
2.4.1	Micro-organismos aeróbios mesófilos	35
2.4.2	Micro-organismos da família <i>Enterobacteriaceae</i>	35
2.4.3	<i>Escherichia coli</i>	36
2.5	MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS	37
2.5.1	<i>Salmonella spp</i>	37
2.5.1.1	Classificação	38
2.5.1.2	Ecologia	38
2.5.1.3	Prevalência.....	39
2.5.1.4	Características culturais e identificação	40
2.5.2	<i>E. coli</i> O157:H7	42
2.5.2.1	Classificação	42
2.5.2.2	Ecologia	43
2.5.2.3	Prevalência.....	44
2.5.2.4	Características culturais e identificação	45
2.6	MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS..	45
2.6.1	Os ácidos orgânicos	47
2.6.2	O ácido láctico	49
2.6.3	O vapor e a água quente	50
2.7	MÉTODOS DE DETECÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	51
2.7.1	Método convencional ou tradicional	52
2.7.2	Métodos rápidos ou alternativos	53
2.7.2.1	PETRIFILM TM	54
2.7.2.2	TEMPO®.....	57
2.7.2.3	VIDAS E. COLI O157 (VIDAS ECO).....	60

3	AVALIAÇÃO DA INFLUENCIA DO ÁCIDO LÁTICO E DA ÁGUA QUENTE NA DESCONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM CARCAÇAS SUÍNAS NO BRASIL	63
3.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.1.1	Amostras.....	64
3.1.2	Metodologia utilizada para aspersão de água e ácido láctico.....	64
3.1.3	Metodologia utilizada para os ensaios microbiológicos.....	65
3.1.4	Análise Estatística.....	65
3.2	RESULTADOS	66
3.3	DISCUSSÃO	68
3.4	CONCLUSÕES.....	72
4	MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS EM CARCAÇAS SUÍNAS.....	73
4.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
4.3	CONCLUSÕES.....	79
5	INVESTIGAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 EM CARCAÇAS SUÍNAS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL.....	81
5.1	AMOSTRAS	82
5.2	DETECÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7	82
5.3	RESULTADOS	84
5.4	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	84
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
	REFERÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

Devido às condições sanitárias dos animais destinados ao consumo e às demandas provocadas pela Segunda Guerra Mundial, deflagrada na Europa em meados do século XX, iniciou-se, no Brasil, a instalação dos primeiros abatedouros, já com a criação dos Serviços de Veterinária, em 1915. Tais serviços eram responsáveis pela inspeção sanitária dos animais e pela sua regulamentação, com as primeiras regras sobre a inspeção *ante e post mortem* dos animais de abate e da higiene do processo (PARDI, 1996).

Com o objetivo de aumentar a segurança microbiológica e a higiene do processo de abate, a partir do ano de 1997, os estabelecimentos de abate que funcionavam seguindo as normas do Serviço de Inspeção Federal no Brasil para a produção de carne e produtos de origem animal tiveram que implantar programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e programas de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (BRASIL, 1997). Entretanto, mesmo com a implantação desses programas nos estabelecimentos de abate, fatores como o *status* sanitário do rebanho, o transporte dos animais da granja produtora até o abatedouro, o tempo de descanso no abatedouro, o jejum e a dieta hídrica do lote antes do abate podem afetar a condição microbiológica das carcaças suínas (HUIS in't VELD; MULDER; SNIJDERS, 1994).

Muitos são os perigos que podem ser detectados na inspeção *ante mortem* dos suínos e que podem representar um risco à saúde pública. No entanto, os perigos atuais, como patógenos causadores de toxinfecções alimentares, não são detectados pela inspeção visual tradicional no *ante mortem* ou no *post mortem* (SCOTT et al., 2008).

Os micro-organismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo a *Escherichia coli* e seus sorotipos patogênicos - como o O157 -, juntamente com a *Salmonella* spp., além de outras enterobactérias, são alguns dos perigos microbiológicos considerados, que devem ser controlados na carne fresca (SOFOS, 2008; LARA et al., 2011).

A carne suína, assim como as demais carnes provenientes de diferentes espécies animais, pode carregar esses patógenos da granja produtora a mesa do consumidor. A presença desses micro-organismos na carne é o resultado da contaminação dos animais vivos, dos equipamentos, dos manipuladores e do ambiente. Medidas de controle devem ser adotadas para prevenir a disseminação de patógenos dos animais abatidos para o homem (NESBAKKEN; SKJERVE, 1996; SOFOS; BELK; SMITH, 1999).

Desta forma, métodos de descontaminação bacteriana podem ser necessários como uma efetiva intervenção, no sentido de reduzir a contaminação após o abate (SWANENBURG et al., 2001). Esses processos de descontaminação de carcaças são baseados em imersão, lavagem ou aspersão de água ou soluções químicas e são utilizados em diversos países, como Estados Unidos da América (EUA), Canadá e Austrália. Podem ser designados como um ponto crítico de controle nos programas APPCC desenvolvidos pelas indústrias (SOFOS; BELK; SMITH, 1999). No Brasil estas técnicas não são utilizadas, pois seu uso não está previsto na legislação.

Para avaliar a condição microbiológica destas carcaças são utilizados métodos laboratoriais convencionais ou também chamados tradicionais, para a realização de ensaios microbiológicos que detectam e contam células bacterianas viáveis nos alimentos. Esses métodos são sensíveis, baratos e podem expressar informação qualitativa e quantitativa sobre os micro-organismos presentes na amostra, porém demandam diversos dias para a obtenção de resultados, pois dependem da capacidade dos micro-organismos multiplicarem-se para que haja colônias visíveis (BOER; BEUMER, 1999). Da mesma forma, métodos laboratoriais rápidos necessitam ser inseridos na rotina diagnóstica para prover informação adequada da possível presença de patógenos na matéria prima e nos produtos acabados, para o controle do processo de produção e para o monitoramento de práticas de higiene e limpeza (BOER; BEUMER, 1999).

Neste contexto, percebe-se a importância de minimizar os riscos sanitários presentes desde a produção primária até o abate desses animais e de utilizar métodos rápidos de controle microbiano durante o processo.

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram divididos em objetivo geral:

Avaliar a influência do uso de ácido lático e da água quente, na lavagem de carcaças suínas, sobre a população microbiana, em condições normais de abate, utilizando métodos laboratoriais convencionais e métodos alternativos.

E objetivos específicos:

- a) avaliar a microbiota presente na superfície de carcaças suínas por meio da contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos, enterobactérias, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *E. coli*

- O157 utilizando diferentes metodologias convencionais e alternativas;
- b) avaliar a redução da contaminação de carcaças suínas com o uso de processos descontaminantes: ácido láctico 1,5% e água com temperatura entre 76°C e 78° C;
 - c) comparar os resultados das contagens de micro-organismos encontrados pela metodologia convencional, com os resultados das metodologias alternativas PetrifilmTM e TEMPO®;
 - d) pesquisar *Salmonella* spp. por metodologia Convencional.
 - e) pesquisar *E. coli* O157 pelo Sistema VIDAS®.

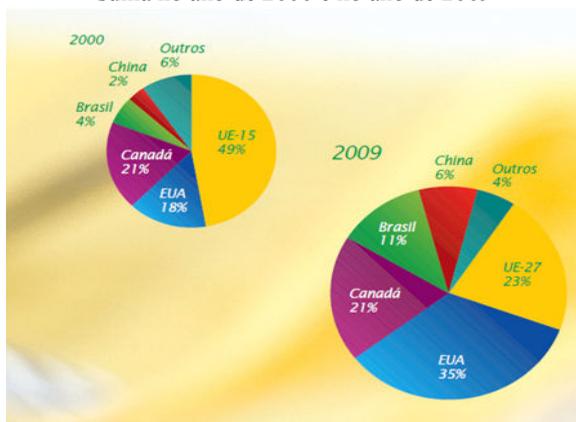
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para embasar esta pesquisa organizou-se o estudo em oito seções: a carne suína brasileira; a produção primária de suínos; o processo de abate de suínos; a microbiota dos suínos; micro-organismos indicadores; micro-organismos patogênicos; métodos de descontaminação de carcaças; e, métodos de detecção microbiológica.

2.1 CARNE SUÍNA BRASILEIRA

Hoje, o Estado de Santa Catarina, no Sul do Brasil, destaca-se no abate de suínos, sendo considerado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), livre de Febre Aftosa sem vacinação. O Estado é responsável pelo abate de 7,8 milhões de suínos, em 25 abatedouros sob o Serviço de Inspeção Federal, representando 27,40% do abate nacional de suínos, que foi de 28,5 milhões no ano de 2010. A carne suína é a proteína mais consumida no mundo, com uma produção de 115 milhões de toneladas, sendo quase a metade produzida na China e outro terço na União Europeia (UE) e nos Estados Unidos da América (EUA). A participação do Brasil tem crescido em importância no mercado mundial. O País é o quarto maior produtor, com 3% da produção e 11% das exportações. O comércio internacional de carne suína movimenta 5,4 milhões de toneladas e gera uma receita anual aproximada de 11,9 bilhões de dólares. Está concentrado em cinco países importadores (Japão, Federação Russa, México, Coreia do Sul e Hong Kong). Os Estados Unidos, a União Europeia, o Canadá, o Brasil e a China são responsáveis por 96% das exportações mundiais. O principal destaque dos últimos anos é o desempenho das vendas externas brasileiras, que em dez anos ampliaram sua participação nas exportações mundiais de 4% para 11% (Figura 1). Mesmo com as barreiras sanitárias, com o aumento dos subsídios europeus e o crescimento da concorrência internacional, as exportações brasileiras cresceram acima da média dos competidores (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA, 2010).

Figura 1 - Participação do Brasil no mercado mundial de exportação de carne suína no ano de 2000 e no ano de 2009



Fonte: Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (2010)

2.1 PRODUÇÃO PRIMÁRIA DE SUÍNOS

O suíno ou porco doméstico – *Sus scrofa domesticus* — pertence à classe dos Mamíferos, ordem dos Ungulados, subordem dos Artidáctilos, família dos Suídeos. Forma o gênero *Sus* (*Sus scrofa*, *Sus vitatus*) (VIANNA, 1974). Foi domesticado por volta de 2500 a.C. e tornou-se consideravelmente importante no período greco-romano pela sua carne, quando os pernis eram salgados e defumados e as salsichas eram produzidas (LAWRIE, 2005). No Brasil, a suinocultura pode ser dividida em industrial (tecnificada) e de subsistência, com a presença de produtores familiares, patronais e empresariais. Sua produtividade tem crescido de forma constante, desde 2004, com avanços tecnológicos em genética, sanidade, nutrição, instalações, manejo e bem-estar animal, resultando no aumento da eficiência técnica (conversão alimentar e produtividade das matrizes) e da qualidade dos animais entregues ao abate (rendimento de carne magra de carcaça), sendo a região sul do Brasil a mais importante área de produção suína no país (MIELE; MACHADO, 2010).

A produção primária deve receber uma atenção especial através de programas de controle e vigilância de patógenos, os quais incrementam o risco das infecções alimentares em humanos (CORTIÑAS et al., 2009). A disseminação de infecções entre os animais pode ser substancialmente diminuída com o desenvolvimento de

intervenções estratégicas nos rebanhos, contribuindo para a proteção da cadeia alimentar, da fazenda ao garfo do consumidor (BEARSON; BEARSON, 2011). Porém, somente a inspeção das carcaças e a higiene nos abatedouros e nos demais processos de manipulação não são suficientes para garantir a segurança e a qualidade sanitária esperada (BLAHA, 2001).

A higiene da carne é definida como “todas as condições e medidas necessárias para garantir a inocuidade e aptidão da carne em todas as etapas da cadeia alimentar” (CODE..., 2004a). Neste contexto da higiene da carne, deveríamos aplicar medidas apropriadas para proteger a saúde pública e atingir a satisfação dos critérios de resultados quantitativos, requeridos para o controle dos perigos (CONTROL..., 2006).

A redução dos níveis de carcaças contaminadas no abatedouro poderá ser alcançada pela identificação e controle das fontes de contaminação em todos os estágios de produção, principalmente antes do período pré-abate (BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004; JORDAN et al., 2006; LO FO WONG et al., 2002; SCHWARZ et al., 2009). Assim sendo, a habilidade em se controlar as doenças causadas por micro-organismos presentes nas carnes e em produtos cárneos será efetivamente atingida, pela redução da prevalência da infecção nos animais ainda nas granjas produtoras, assim como pelas intervenções nos outros estágios de transmissão do animal para o homem (HUMPHREY; JORGENSEN, 2006).

2.2 PROCESSO DE ABATE DE SUÍNOS

Esta seção contempla todas as etapas de abate em um frigorífico de suínos, desde a chegada dos animais ao abatedouro até a expedição da carcaça.

2.2.1 Manejo pré-abate

O manejo pré- abate inicia-se ainda com os suínos na granja produtora, com o carregamento, o transporte em caminhões e o descarregamento no abatedouro, onde são agrupados em lotes e permanecem nas pocilgas por um período que varia de 6 a 24 horas (BRASIL, 1952; BRASIL, 1995). Esses procedimentos devem atender aos preceitos de bem-estar animal para minimizar os riscos de quedas, brigas e estresse pré-abate, que podem comprometer a qualidade

sanitária da carcaça durante e após o abate (DALLACOSTA et al., 2007; GREGORY, 2008).

Nesse intervalo de tempo, em que os suínos aguardam na pocilga do abatedouro, permanecem em jejum e dieta hídrica, com o objetivo de esvaziar o conteúdo intestinal (BRASIL, 1952; BRASIL, 1995). Esses animais podem ser portadores assintomáticos de bactérias patogênicas e servir de fonte para a contaminação da carne (LARA et al., 2011; NESBAKKEN et al., 2003; SOFOS; BELK; SMITH, 1999) a partir do trato digestório, dos instrumentos e dos equipamentos envolvidos no processo, ocorrendo contaminação cruzada de ambas as fontes (RIVAS; VIZCAINO; HERRERA, 2000).

As pocilgas do abatedouro (Figura 2) tornam-se fontes de contaminação entre os diferentes lotes de suínos no período pré-abate, por receberem material fecal de animais de diferentes níveis sanitários, podendo ser encontradas diversas enterobactérias, como *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* nos suínos ou no piso da pocilga (BINTER et al., 2011; FRANSEN et al., 1996; LO FO WONG et al., 2002; SWANENBURG et al., 2001; VIEIRA PINTO et al., 2010).

Figura 2 - Pocilgas do abatedouro frigorífico onde os suínos permanecem em jejum e dieta hídrica antes do abate



Fonte: Rotta (2010)

As bactérias entram nos abatedouros por meio dos animais (pelo, pele, patas); no interior de animais, portadores assintomáticos (trato gastrointestinal) (BAGGESEN et al., 1996) e também por meio de pessoas. Não há nenhum procedimento de inspeção visual específico e direto para detecção de algumas bactérias patogênicas, como a

Salmonella spp., que pode ser transmitida para os consumidores (SAIDE-ALBORNOZ et al., 1995), pela carne desses animais, durante o abate e processamento (BEARSON; BEARSON, 2011). A inspeção *ante mortem* dos suínos é realizada no pré-abate, quando os animais se encontram na pocilga do abatedouro, e remove do abate os animais excessivamente sujos e obviamente doentes, mas, por si só, não pode prevenir o abate de suínos com potenciais agentes patogênicos no intestino ou na pele. O *Codex Alimentarius* define inspeção *ante mortem* como “procedimentos e testes” a serem realizados pela autoridade competente, baseados em conhecimento científico para, integrados, atingir o objetivo de saúde pública e animal (CODE..., 2009). Esse procedimento é realizado na rotina de todos os abatedouros, desde o momento do descarregamento até a entrada destes animais na área do abate (BRASIL, 1995).

2.2.2 Abate

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1995), a área do abate destina-se às operações compreendidas a partir da insensibilização até a entrada das carcaças nas câmaras de resfriamento, incluindo o espaço destinado à inspeção final das carcaças, chamado de Departamento de Inspeção Final (DIF). A inspeção final das carcaças é um procedimento da inspeção *post mortem* no qual o inspetor julga a aptidão ou não da carcaça para consumo humano. As operações do abate (Figura 3) são realizadas em duas áreas distintas e separadas fisicamente, chamadas de área suja e área limpa, onde são realizadas as seguintes operações:

Área suja: insensibilização, sangria, lavagem após sangria, escaldagem, depilação, chamuscamento e toailete. A operação de polimento é facultativa e a operação de toailete inclui a retirada dos cascos remanescentes, pelos e ouvido médio;

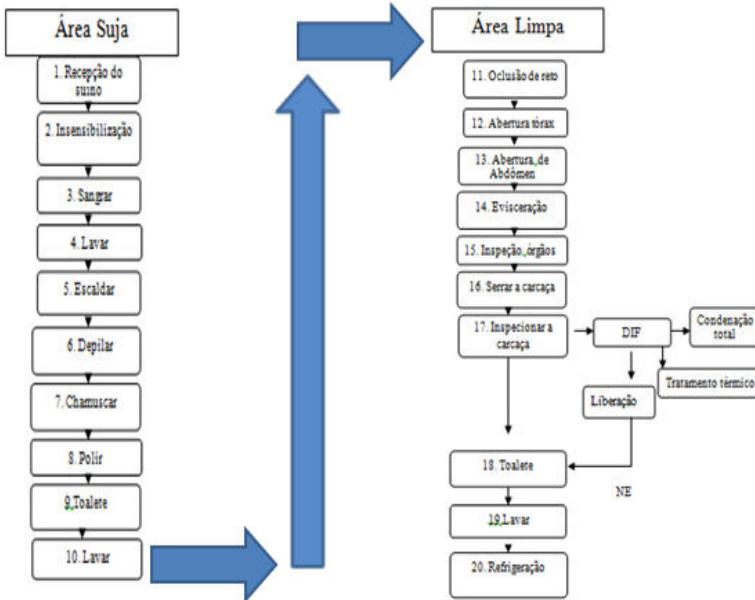
Área limpa: oclusão do reto, abertura abdominal e torácica, abertura da papada, inspeção de cabeça e papada, retirada e inspeção de órgãos, divisão longitudinal das carcaças, inspeção de carcaças, retirada do rabo, cabeça, unto e patas, toailete da carcaça e lavagem final.

Durante o abate, grandes quantidades de carcaças de diferentes origens são manipuladas ao mesmo tempo e em espaços muito próximos, podendo haver vários patógenos presentes, provenientes de animais de diferentes plantéis. Cria-se, portanto, uma oportunidade para que ocorra a contaminação cruzada ou disseminação desses patógenos

no ambiente, em equipamentos ou nas carcaças (LO FO WONG et al., 2002).

Patógenos emergentes, como a *Listeria monocytogenes*, a *Escherichia coli* O157:H7 (SOFOS et al., 1999) e a *Salmonella* sp. são responsáveis por aumentar o risco de contaminação das carcaças no abate (DE BUSSER et al., 2011; KICH et al., 2005).

Figura 3 - Fluxograma dos procedimentos de abate de suínos



Fonte: Adaptado da Portaria 711/95 (1995)

2.2.3 Operações da área suja

A insensibilização do suíno pode ser realizada por eletroanestesia, eletrocussão ou por dióxido de carbono e é necessária a perda de consciência do animal (GREGORY, 2008). Em seguida, o animal é sangrado utilizando-se facas higienizadas para efetuar incisões nos grandes vasos, o que promove o escoamento do sangue de forma rápida, profusa e completa, ocasionando choque hipovolêmico e morte do animal (ANIL; WHITTINGTON; MCKINSTRY, 2000).

As carcaças são então penduradas pelo membro posterior e seguem por trilhos aéreos até o chuveiro, onde a carcaça é lavada apenas

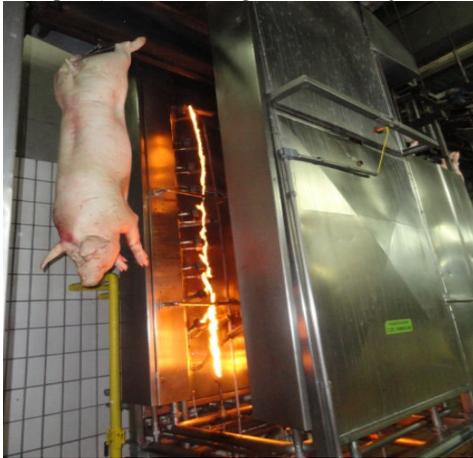
com água à temperatura ambiente. Após a lavagem, a carcaça é escaldada e depilada com equipamentos próprios para esta finalidade, com água controlada à temperatura mínima de 62°C (BRASIL, 1995). Nesta etapa, ocorre a redução de contagens microbiológicas na superfície da carcaça (BOLTON; PEARCE; SHERIDAN, 2002; INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 2005; LO FO WONG et al., 2002) e o risco de contaminação por *Salmonella* spp. por meio da água de escaldagem pode ser minimizado se a temperatura da água da escalda estiver acima de 60°C e se o suíno permanecer no tanque de escaldagem, no mínimo, de 1 a 4 minutos (BOLTON et al., 2003).

Em seguida, as carcaças são polidas, com o objetivo de remoção de resíduos de pelos. Nesta etapa, pode ocorrer um incremento da contaminação, ocasionada pelo contato dos chicotes de polimento com a carcaça. Esta contaminação é eliminada na próxima etapa do processo de abate, que é o chamuscamento (BOLTON; PEARCE; SHERIDAN, 2002; BERENDS et al., 1997).

Na etapa de chamuscamento ou flambagem, as carcaças passam pelo interior de um equipamento que possui bicos e que lançam chamas sobre a sua superfície, destruindo os micro-organismos superficiais que estão na pele do suíno e queimando os resíduos de pelo (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 2005).

A flambagem ou chamuscamento é referenciada por destruir os micro-organismos por ação direta do calor (Figura 4). O baixo percentual de *Salmonella* spp., verificado após *swab* de carcaças suínas, amostradas após a flambagem no abate, é alcançado pela combinação das etapas de processamento (SAIDE-ALBORNOZ et al., 1995). Esta operação é seguida de toailete, que pode ser um ponto de recontaminação da carcaça, e posterior lavagem das carcaças com água à temperatura ambiente encerrando as operações da zona suja do abate (BRASIL, 1995). Toda a água utilizada na indústria deve ser clorada e ter o teor máximo de cloro residual livre em qualquer ponto do sistema de abastecimento de 2 mg/L que é o padrão de potabilidade da água para consumo humano (BRASIL, 2011).

Figura 4 - Operação de flambagem na área suja do abate de suínos



Fonte: Cattani (2010)

2.2.4 Operações da área limpa

A primeira operação da área limpa é a oclusão do reto, realizada de forma manual ou mecânica, separando-se a porção final do reto dos tecidos adjacentes, ensacando-a e amarrando-a (BRASIL, 1995). O objetivo desse procedimento é evitar que o conteúdo fecal saia do reto e entre em contato com a carcaça, sendo de suma importância para minimizar a contaminação fecal (BERENDS et al., 1997; PEARCE et al., 2004). Em seguida, ocorre a abertura abdominal e torácica, que consiste no corte mediano ventral das respectivas paredes, seguida de exposição dos órgãos internos para o exterior das cavidades seccionadas. Esse procedimento é chamado de evisceração e é considerado um ponto de controle importante da contaminação fecal em carcaças (BOLTON; PEARCE; SHERIDAN, 2002; DE BUSSER et al., 2011).

2.2.4.1 Procedimentos de inspeção *post mortem*

A inspeção *post mortem* consiste no exame da carcaça, partes da carcaça, cavidades, órgãos, tecidos e linfonodos, realizada por visualização, palpação, olfação e incisão quando necessário (Figura 5). Esta etapa é dividida em linhas de inspeção, que inclui a inspeção da cabeça, da papada, do útero, do conjunto composto de intestino, estômago, baço, pâncreas e bexiga, do coração, da língua, dos pulmões, do fígado, dos rins e inspeção da carcaça. Estes procedimentos são

realizados visualmente, por palpação e cortes onde for necessário, com equipamentos e local próprios para este fim. A inspeção deve evitar a contaminação de carcaças, visualmente em boas condições sanitárias, por aquelas contaminadas ou com lesões sugestivas de doenças (BRASIL, 1995). A papada deve ser aberta e os músculos masseteres e pterigoideos seccionados com cortes que permitam manter íntegros os linfonodos da região, com o objetivo de evitar que bactérias patogênicas, como *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* sp., presentes em linfonodos e tonsilas, não sejam espalhadas neste procedimento (DE BUSSER et al., 2011; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2009; FRONDREVEZ et al., 2010; VIEIRA-PINTO et al., 2012).

Figura 5 - Inspeção post-mortem de intestino de suínos com corte dos linfonodos mesentéricos



Fonte: Rost (2008)

Finalizados os procedimentos de inspeção *post mortem*, as carcaças seguem para a operação de toailete, que inclui a retirada da ferida da sangria, da medula espinhal e dos linfonodos, seguida da lavagem das carcaças com água à temperatura ambiente. A lavagem é realizada com a carcaça passando pelo interior do chuveiro, localizado no final da zona limpa do abate. O banho dura em torno de 3 a 4 segundos. Esse chuveiro deve ser construído em forma de box metálico, de aço inoxidável, com a largura de 1,60m, altura mínima de 4m,

comprimento de acordo com a velocidade horária de abate, prevendo-se 3,60m para velocidades de abate de até trezentos suínos por hora. A água deve ser em forma de jatos em volume suficiente e com pressão de 3atm (três atmosferas), provindo de instalações hidráulicas tubulares localizadas nas partes superior, mediana e inferior do Box. O escoamento das águas residuais deve ser diretamente para o esgoto, por meio de tubulação própria (BRASIL, 1995).

As carcaças seguem, após o banho (Figura 6), para o resfriamento, que ocorre nas câmaras frigoríficas com temperatura controlada entre -1°C e 1°C e velocidade do ar de 2 a 3 metros por segundo. Esta etapa encerra as operações da zona limpa do abate e as carcaças só saem das câmaras quando a temperatura interna medida no interior do pernil atingir, no mínimo, 7°C (BRASIL, 1995). A refrigeração previne a multiplicação de patógenos mesofílicos e reduz a multiplicação de patógenos psicotróficos e micro-organismos deteriorantes. A baixa temperatura do ar no interior das câmaras, associada à velocidade do ar e à umidade relativa, faz com que ocorra uma rápida perda de água da superfície das carcaças, tornando-as mais secas. O resfriamento da superfície e a baixa atividade de água (aw) retarda a multiplicação de alguns patógenos e é letal para outros (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 2005). Isso pode ser explicado nos termos da termodinâmica, pelo decréscimo na entropia. O resultado é um incremento da concentração de solutos compatíveis, em resposta ao *stress* pela baixa temperatura e osmose, dificultando a homeostase do citoplasma celular, a conservação da energia e, conseqüentemente, a sobrevivência e multiplicação bacteriana (MCMEEKIN et al., 2010).

Diversos autores enfatizam a importância do *status* sanitário do suíno na transmissão bacteriana durante os procedimentos de inspeção sanitária, devido aos cortes realizados nos linfonodos e concomitante manipulação dos órgãos, levando à contaminação cruzada das carcaças no abate (BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004; HUMPHREY; JORGENSEN, 2006; OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2009).

Figura 6 - Chuveiro de lavagem de carcaças de suínos localizado no final da área limpa do abate



Fonte: Cattani (2010)

O Comitê Científico Sobre as Medidas Veterinárias Relacionadas Com a Saúde Pública da Comunidade Européia emitiu opinião sobre a revisão dos procedimentos de inspeção de carnes, após ser requisitado para rever os passos da inspeção *ante* e *post mortem* de suínos, prevista na Diretiva 64/433/EEC e Diretiva 91/497/EEC. Esse comitê concluiu que o atual procedimento de inspeção tem maiores limitações para prevenir as infecções zoonóticas em humanos. Eles não verificaram nenhum risco à saúde humana por transmissão a partir das lesões encontradas nos suínos abatidos durante os procedimentos de observação e palpação na inspeção *post mortem*. Há, sim, o risco de contaminação cruzada por patógenos presentes, pela manipulação e incisão de carcaças e órgãos durante a inspeção *post mortem* (EUROPEAN COMMISSION, 2000).

2.3 MICROBIOTA DOS SUÍNOS

A possibilidade de contaminação microbiana da superfície da carcaça de suínos em um abatedouro é ampla, tanto por bactérias deteriorantes quanto por patogênicas (LIMA et al., 2004). Desta forma é necessário conhecer a microbiota presente nos suínos.

Em todo o aparelho digestório do suíno, que inclui a nasofaringe até o intestino, encontramos patógenos potenciais, como *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*,

Salmonella spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Campylobacter* spp.. Os linfonodos mesentéricos podem conter *Salmonella* spp., *Micobacterium* spp., *Rodococcus equi* e *Yersinia enterocolitica*. A pele é uma fonte, não apenas de *Staphylococcus aureus* e *S. hyicus*, bacilos e outros mesófilos, mas também de MICRO-organismos de origem fecal como resultado da contaminação adquirida na fazenda, durante o transporte ou nas pocilgas dos abatedouros, como a *Salmonella* spp. (CORNICK; HELGERSON, 2004; LARA et al., 2011; MATARAGAS; SKANDAMIS; DROSINOS, 2008; NESBAKKEN et al., 2003; VELOSO, 2000).

Em investigação realizada por Lara et al. (2011) no abate, numa amostragem de 258 linfonodos suínos submaxilares e mesentéricos (129 com lesões e 129 sem lesões aparentes de linfadenite), foram encontrados *Mycobacterium* spp., *Rodococcus equi*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e outras enterobacterias, sendo estes micro-organismos isolados em 105 (81,4%) dos 129 linfonodos com lesão e 34 (26,3%) dos sem lesão. Da mesma forma, Nesbakken et al. (2003), investigaram a ocorrência de *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* spp nos tecidos linfoides e trato intestinal de suínos, bem como o risco de contaminação durante a inspeção *post mortem* e concluíram que a incisão dos linfonodos submaxilares representa um risco para a contaminação cruzada por *Yersinia*, assim como a incisão dos linfonodos mesentéricos. *Campylobacter* spp. foi encontrado em 100% do trato intestinal dos animais abatidos e em 66,7% das tonsilas.

No Brasil, Bessa, Costa e Cardoso (2004), estudando a prevalência de *Salmonella* spp. em 300 suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do sul, encontrou *Salmonella* spp. em 167, sendo que 53 apresentaram *Salmonella* spp. apenas nos linfonodos mesentéricos, 55 apenas no conteúdo fecal e 59 em ambos os materiais coletados. No Estado do Mato Grosso do sul, Silva et al. (2009) coletaram 300 amostras de linfonodos mesentéricos e tonsilas de suínos abatidos e encontraram 50 amostras positivas para *Salmonella* spp. e 14 diferentes sorovares.

Esses estudos demonstram a diversidade de patógenos encontrados durante os procedimentos de abate e a importância em se manejar os riscos associados à segurança da carne, desenvolvendo estratégias de controle dos patógenos em todas as etapas do processamento (SOFOS; GEORNARAS, 2010).

2.4 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES

Os micro-organismos indicadores são utilizados para avaliar a eficácia de procedimentos que influenciam na qualidade microbiológica dos alimentos.

2.4.1 Micro-organismos aeróbios mesófilos

Os micro-organismos mesófilos correspondem à grande maioria daqueles importantes em alimentos, inclusive a maior parte dos patógenos em alimentos. Têm a temperatura ótima de multiplicação, entre 25°C e 40°C, mínima entre 5°C e 25°C e máxima entre 40°C e 50°C. A contagem é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos. Mesmo que os patógenos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações nas características sensoriais, um número elevado de micro-organismos indica que o alimento é insalubre. Exceção deve ser feita aos alimentos fermentados (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Para contagem de mesófilos totais, utiliza-se o método de plaqueamento por profundidade em ágar padrão para contagem. O método baseia-se na contagem do número de células viáveis, isto é, a capacidade de uma célula se dividir e se multiplicar em um meio de cultura adequado. Estão inclusos no grupo de mesófilos totais, os micro-organismos mesófilos aeróbios, anaeróbios e aeróbios facultativos (BRASIL, 2003).

2.4.2 Micro-organismos da família *Enterobacteriaceae*

Membros da família *Enterobacteriaceae* não são confinados apenas ao trato intestinal e podem ser isolados de uma variedade de fontes não intestinais. Esses membros são bons indicadores do processo de higiene ambiental porque são prontamente inativados por sanitizantes e capazes de colonizar uma variedade de nichos na planta processadora quando sua sanitização é inadequada (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

No Brasil, as enterobactérias e a *Escherichia coli* são utilizadas como micro-organismos indicadores para determinar a higiene do processo de abate de suínos. A coleta é realizada por meio de *swab* da superfície da carcaça, em estabelecimentos exportadores (BRASIL, 2007).

Fazem parte dessa família, os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*,

Salmonella, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Na Europa, as enterobactérias são usadas há anos como indicador de qualidade, enquanto nos EUA, tradicionalmente, utiliza-se o grupo coliforme. O grupo coliforme é definido com base nas suas reações bioquímicas e não com base em relações genéticas; referem-se às bactérias na forma de bacilos que fermentam a lactose, formando ácido e gás dentro de 48 horas, a 35°C. Os chamados coliformes fecais ou termo-tolerantes são definidos como aqueles que fermentam a lactose, formando ácido e gás dentro de 48 horas, a 44,5° e 45,5°C, usualmente em caldo EC (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

As enterobactérias são bactérias anaeróbias facultativos, Gram-negativas, fermentam a glicose em ácido, são oxidase negativa, usualmente catalase positiva, normalmente reduzem nitrato e podem ou não ser móveis (KORNACKI; JOHNSON, 2001). A contagem baseia-se na inoculação das diluições desejadas da amostra em ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBG), cuja composição evidencia a habilidade dos micro-organismos fermentarem a glicose com produção de ácido, reação indicada por uma viragem do indicador para vermelho e a precipitação de sais biliares ao redor das colônias. A seletividade é exercida pela presença de cristal violeta e bile no meio. Após o crescimento, as colônias são confirmadas pelo teste da oxidase. Neste teste, o aparecimento de cor azul (N'N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho intenso (oxalato de para-amino-dimetilanilina) é indicativo de reação positiva. Todas as enterobactérias apresentam reação de oxidase negativa (BRASIL, 2003).

2.4.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é um componente normal da microbiota intestinal dos animais de sangue quente, incluindo o homem (ACHA; SZYFRES, 2003). As cepas comensais de *E. coli* raramente causam doença, exceto em animais imunologicamente comprometidos ou quando a barreira gastrointestinal normal é quebrada (MENG et al., 2007).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa e anaeróbia facultativa. Nas reações bioquímicas, apresenta o seguinte perfil: produz ácido e gás a partir do metabolismo da glicose, oxidase negativa, catalase positiva, vermelho de metila positiva e reação Voges-Proskauer negativa; usualmente citrato negativa. Não produz sulfeto de hidrogênio, não hidrolisa a uréia e nem a lipase. Reduz nitrato. Produz indol a partir

do metabolismo do triptofano e produz a enzima β -glicorunidade (BERGEY et al., 1994).

A atividade da enzima β -D- glicorunidade é específica da *E. coli* e de algumas cepas de *Shigella*. O 4-metilumbeliferil - β -D- glicorunideo (MUG), quando incorporado no caldo de cultivo da *E. coli*, será clivado pela enzima presente nessas cepas, tornando-se um composto chamado 4-metilumbeliferona que floresce quando exposto a longos comprimentos de onda. É importante lembrar que cepas enterohemorrágicas de *E. coli*, incluindo a O157:H7, não possuem esta enzima (BLOOD; CURTIS, 1995). A *Escherichia coli* é considerada como o melhor indicador de contaminação fecal para alimentos crus (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

A identificação da *E. coli* baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras em ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA) e posterior contagem das colônias suspeitas. O ágar cristal violeta vermelho neutro bile apresenta, em sua composição, sais biliares e cristal violeta, responsáveis pela inibição de micro-organismos Gram positivos e vermelho neutro, um indicador de pH que revela a fermentação da lactose pelos micro-organismos presentes. A adição de sobrecamada após o inóculo ser homogeneizado com o ágar visa à prevenção do crescimento e do espraiamento de colônias na superfície. As colônias suspeitas são inoculadas em Caldo EC com tubos de Durham. A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a fermentação da lactose presente no meio. A pesquisa de *Escherichia coli* é realizada transferindo-se uma alçada dos tubos positivos de caldo EC para placa de Eosina Azul de Metileno (EAM), que é evidenciada pela presença de colônias púrpuras com centro escuro e brilho metálico esverdeado característico, após incubação a 36 °C, por 24 horas. A confirmação de *Escherichia coli* é realizada a partir dos testes bioquímicos (BRASIL, 2003).

2.5 MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS

Inúmeros são os micro-organismos patogênicos que podem causar dano a saúde pública. Este estudo abordará apenas duas enterobactérias classificadas como patogênicas.

2.5.1 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é um membro da família *Enterobacteriaceae* responsável pelo aparecimento de infecções em suínos e em seres

humanos, que pode influenciar na produção de carnes e na saúde pública.

2.5.1.1 Classificação

O gênero *Salmonella* consiste de duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. *Salmonella enterica* possui seis subespécies: *Salmonella enterica* subsp. Enterica, também classificada como I; *Salmonella enterica* subsp. Salamae, ou II; *Salmonella enterica* subsp. Arizonae, ou IIIa; *Salmonella enterica* subsp. Diarizonae, ou IIIb; *Salmonella enterica* subsp. Houtenae, ou IV; *Salmonella enterica* subsp. Indica, ou VI e inúmeros sorotipos baseados nas características sorológicas de cada subespécie (D'AOUST; MAURER; BAILEY, 2007). Apenas vinte e um sorovares pertencem às espécies de *Salmonella bongori*, também conhecida como subespécie V, tendo sido reportado um novo sorovar no ano de 2005 (HERRERA-LEÓN et al., 2005).

Conforme a classificação de Kauffmann-White, a *Salmonella* está dividida em sorotipos, distinguidos pela sua estrutura antigênica, composta por antígenos O somático, H flagelar e Vi capsular (D'AOUST; MAURER; BAILEY, 2007). Suínos são hospedeiros de numerosos sorotipos de *Salmonella* e considerados como o principal reservatório de *Salmonella choleraesuis*, responsável pela enterite necrótica, comum em rebanhos que vivem em precárias condições de higiene. Os sorotipos que atacam os suínos incluem *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Dublin*. Esses sorotipos são geralmente isolados do intestino e dos linfonodos mesentéricos. Devido à frequência de infecção de suínos com diferentes sorotipos de *Salmonella*, produtos derivados desses animais têm sido, comumente, fonte de infecção humana (ACHA; SZYFRES, 2003). Em geral, suínos infectados com estes sorotipos de *Salmonella* são portadores saudáveis, considerados portadores assintomáticos, de importância em saúde pública (FEDORKA-CRAY; GRAY; WRAY, 2000).

2.5.1.2 Ecologia

As infecções por *Salmonella* são reconhecidas como zoonoses e seu habitat é o trato intestinal de mamíferos e aves (animais de sangue quente), porém também é encontrada em alguns animais de sangue frio, como os répteis (ACHA; SZYFRES, 2003). Mais de 60% de todas as cepas identificadas e 99% dos sorotipos responsáveis por doenças em animais de sangue quente são membros da subespécie I. As outras

subespécies de *Salmonella*, em particular subespécies IIIa e *Salmonella bongori*, são associadas a doenças em animais de sangue frio (HERRERA-LEÓN et al., 2005).

Salmonella spp. podem permanecer nos caminhões de transporte, nas pocilgas, nos pisos e nos equipamentos no abatedouro quando excretadas de lotes de suínos soropositivos, mesmo após procedimentos de limpeza e desinfecção (SWANENBURG et al., 2001). Ela pode persistir no suíno por longo período, especialmente no trato digestório e no tecido linfático correspondente, principalmente nas tonsilas, nos linfonodos mesentéricos e mandibulares. A presença de *Salmonella* spp. nos linfonodos mandibulares (normais na aparência) constitui um risco, pois esse tecido pode permanecer na cabeça - com a carcaça - após o abate e, também, porque eles são incisados durante a inspeção sanitária, permitindo uma contaminação cruzada por meio da faca do inspetor (VIEIRA-PINTO et al., 2010). O processo de evisceração, toailete e inspeção *post mortem*, juntos, resultam no incremento de 5% a 10% de *Salmonella* spp. nas carcaças suínas (BERENDS et al., 1997).

Salmonella spp. possui a capacidade de persistir em ambientes hostis e por prolongados períodos de tempo (D'ÁOUST; MAURER; BAILEY, 2007) tornando-se microbiota residente em abatedouros (SOFOS; GEORNARAS, 2010). A carne suína e seus produtos são contaminados com *Salmonella* durante o abate e o processamento, por meio de suínos infectados e assintomáticos ou por infecções subclínicas que chegam ao abatedouro, o que significa um alto fator de risco (GUENTER et al., 2010).

2.5.1.3 Prevalência

Na Dinamarca, de 13468 suínos de terminação (prontos para o abate), 30 diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* foram isolados de 832 suínos (6,2%), sendo *Salmonella* Typhimurium o sorotipo predominante em 536 (64,4%) dos isolados (BAGGESEN et al., 1996).

Estudos para determinar a prevalência de *Salmonella* spp. em suínos abatidos no Sul do Brasil foram realizados por Bessa, Costa e Cardoso (2004), que encontraram prevalências que variaram em 55,6%, sendo que o sorotipo mais encontrado foi o Typhimurium, em 24,36% das amostras, seguido da Agona (19,9%), Derby (13,2%) e Bredeney (12%). Os sorotipos Typhimurium e Derby foram os predominantemente encontrados em estudo realizado por Seixas, Tochetto e Ferraz (2009) em Santa Catarina. Schwarz et al. (2009),

encontraram prevalência de 73,8 % a 83,2% em sangue e linfonodos dos suínos amostrados, com isolamento de 62,5% a 85,0%.

Em experimento conduzido no Estado de São Paulo por Jakabi et al. (2004), a *Salmonella enteritidis* foi o sorotipo mais encontrado (8/23) e 9,1% (23/253) das amostras de carne foram positivas para *Salmonella* spp. Esse percentual foi distribuído em 19,6% de linguiça de carne suína crua, 8,7% de carne suína crua, 7,3% de carne bovina crua e 4,6% de carne de ave, o que demonstra a importância de se controlar o patógeno antes de a carcaça alcançar a refrigeração. Em produtos suínos, como a linguiça frescal, Spricigo et al. (2008) encontraram 27% de *Salmonella* spp. em 200 amostras coletadas no Estado de Santa Catarina, sendo o sorotipo Derby, o mais encontrado. Da mesma forma, Almeida et al. (2000), analisando 169 amostras de alimentos, encontraram 59,7% de *Salmonella* em carnes e produtos cárneos no Estado de São Paulo, sendo o mais encontrado, o sorotipo Enteritidis. Murmann, Santos e Cardoso (2009), analisando 336 amostras de linguiça frescal no Estado do Rio Grande do sul, detectaram 24,4% com *Salmonella enterica*. No Estado de Santa Catarina, de 2007 a 2009, foram analisadas 2492 amostras de carne e produtos cárneos suínos. Em 6,06% delas, foi encontrada *Salmonella* spp., sendo que 7,11% eram cortes e recortes suínos *in natura* (CATTANI, 2011).

Na União Europeia, em 2008, foram reportados 131.468 casos de salmonelose humana, veiculados por alimentos (SCIENTIFIC..., 2010). Nos EUA, foram confirmados 5.267 casos no ano de 2008, pelo CDC (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2008). No Brasil, foram notificados, de 1999 a 2008, 1275 casos ocorridos por *Salmonella* spp, sendo a região sul do Brasil a que mais notificou os casos ocorridos (BRASIL, 2010).

2.5.1.4 Características culturais e identificação

Salmonella spp. são bactérias anaeróbias facultativas, Gram negativas, sob a forma de bastão, que se multiplicam a temperatura ótima de 37 °C e pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Como características bioquímicas, catabolizam D-glicose e outros carboidratos com produção de ácido e, usualmente, gás. São oxidase negativa e catalase positiva, indol e Voges Proskauer negativa, vermelho de metila e citrato de Simons positivo. Utilizam o citrato como fonte de carbono; geralmente produzem sulfeto de hidrogênio com descarboxilação da lisina e ornitidina e não hidrolisam a uréia (BERGEY et al., 1994).

Após o pré-enriquecimento, a identificação de *Salmonella* spp. é realizada com enriquecimento seletivo, com o objetivo de inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover, preferencialmente, a elevação do número de células de *Salmonella*. Utilizam-se dois meios de enriquecimento, visto que a resistência de *Salmonella* aos agentes seletivos varia conforme a cepa: caldo tetratonato (TTB) e caldo Rappaport Vassiliadis (RP). No caldo Rappaport Vassiliadis, a temperatura, associada à presença de verde malaquita e de cloreto de magnésio, atuam como agentes seletivos da flora acompanhante, enquanto que a presença de peptona estimula a multiplicação de *Salmonella*.

No caldo tetratonato, há multiplicação dos micro-organismos que possuem a enzima tetratonato redutase, como *Salmonella* e *Proteus*, ao mesmo tempo em que há a inibição da multiplicação de outros micro-organismos de origem fecal, que não possuem esta enzima.

O verde brilhante e o iodo inibem a multiplicação de micro-organismos Gram-positivos. Logo após, ocorre o plaqueamento em meios seletivos diferenciais para que se obtenham colônias isoladas de *Salmonella*, com características típicas distintas das colônias dos competidores, para posterior confirmação sorológica e bioquímica.

Como meio seletivo diferencial, utiliza-se Ágar entérico de Hektoen (HEA), pois, devido à ação dos indicadores azul de bromotimol e fucsina ácida, demonstra uma expressiva diferença cromática entre as colônias lactose positiva e as colônias lactose negativa. O tiosulfato, ao combinar-se com íons de ferro, atua como indicador na produção de H₂S, observada pelo enegrecimento no centro das colônias. A presença de sais biliares inibe uma grande parte da flora acompanhante.

É realizado, também, o plaqueamento em Ágar xilose lisina desoxicolato (XLD), com a inibição do crescimento de micro-organismos Gram-positivos devido ao desoxicolato presente no meio. A xilose é fermentada por praticamente todos os micro-organismos entéricos, exceto a *Shigella*. A descarboxilação da lisina pelo grupo *Salmonella* torna as colônias de *Salmonella* vermelhas, devido à alcalinização do meio, permitindo a diferenciação de outros micro-organismos que produzem colônias amarelas pela fermentação da lactose e sacarose presentes. São encontrados, também, tiosulfato de sódio e citrato férrico amoniacal, que permitem a produção de H₂S por *Salmonella*, ocorrendo colônias com centro negro. As colônias com crescimento típico são submetidas a uma triagem com teste de descarboxilação da lisina (LIA), fermentação da lactose e/ou sacarose, produção de H₂S no Ágar lisina ferro e Ágar triplíce açúcar ferro (TSI) e

teste de ureia; em caso de negatividade para *Salmonella*, permitem eliminar as etapas subsequentes.

Após a triagem, são submetidas ao teste sorológico somático polivalente (Técnica de aglutinação em lâmina), que se baseia na reação antígeno-anticorpo, com consequente aglutinação do antígeno frente ao anticorpo, para identificar os antígenos O, K e H da *Salmonella*. Para confirmação bioquímica, realizam-se os testes de fermentação do dulcitol, lactose, sacarose, indol, malonato, citrato, ácido cianídrico (KCN), Vermelho de metila e Voges-Proskauer (BRASIL, 2003).

2.5.2 *E. coli* O157:H7

A *E. coli* é um membro da família *Enterobacteriaceae*, cujas cepas patogênicas tornaram-se de importância para a saúde pública a partir da década de 80.

2.5.2.1 Classificação

A *E. coli*, membro da família *Enterobacteriaceae*, é um dos mais importantes patógenos entéricos, assim como a *Salmonella*, a *Shigella* e a *Yersinia*. Embora muitas das *E. coli* não causem doença gastrointestinal, alguns grupos podem causar diarreias, com risco à vida (MENG; ZHAO; DOYLE, 2001). A *E. coli* é classificada em diferentes sorotipos conforme a classificação originalmente desenvolvida por Kauffmann, que é baseada na identificação do antígeno somático O (polissacarídeo e termoestável), que diferencia a *E. coli* em mais de cento e setenta sorogrupos; no antígeno flagelar H, derivado do flagelo das cepas móveis, que é termolábil e é a proteína flagelar que carrega os fatores antigênicos determinantes do grupo H, com mais de cinquenta e três grupos; no antígeno K, que é um polissacarídeo capsular e o F, antígeno fimbrial, para as cepas que apresentam esta estrutura. Cepas sem flagelo são identificadas como NM (*nom motile*) (ACHA; SZYFRES, 2003; MENG et al., 2007).

As cepas patogênicas de *Escherichia coli* são causadoras de diarreia e são classificadas em grupos específicos. A classificação é baseada nas propriedades de virulência, mecanismos de patogenicidade, síndromes clínicas e distintos O:H sorotipos. Essa categoria inclui *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difusa-aderente (DAEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que é o grupo de maior importância, com base na frequência e severidade da doença (MENG et al., 2007).

O grupo da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) inclui a *E. coli* O157:H7 como sorotipo de maior predominância, além de outros sorotipos não-O157, causadores de colite hemorrágica. Todas as EHEC produzem fatores de citotoxicidade em células Vero, chamada de produtora de verotoxina (VT) ou *shiga-like* toxinas (SLTs), que são proteínas tóxicas, biologicamente, estruturalmente e antigenicamente relacionadas com a citotoxina chamada shiga-toxina (ShT), produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1 (AGBODAZE, 1999, MENG et al., 2007).

E. coli de outros sorotipos mostraram-se, também, produtoras de verotoxinas (VT) ou *shiga-like* toxinas (SLT's) e, por isso, foram chamadas de *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC) ou de Verotoxigênica (VTEC), associadas à colite hemorrágica (HC) e à Síndrome Hemolítica Urêmica (HUS) em humanos. As outras cepas não-O157, porém produtoras de colite hemorrágica em humanos têm sido identificadas em vários países e incluem os sorotipos: O26, O111, O103, O121, O45, O145, O91, O118, O119 e O128 (ACHA; SZYFRES, 2003; LEE et al., 2009; MENG et al., 2007; OJO et al., 2010).

As cepas da *E. coli* O157:H7 podem carregar diversos fatores de virulência, como os genes *stx1* e *stx2*, produtores das Shiga toxinas e o gene *eae*, que causam importante efeito de aderência nas células por codificação da intimina, chamado "*attaching and effacing*", além do gene *hlyA*, que possui atividade hemolítica. Possui, também, um plasmídeo chamado pO157 de, aproximadamente, 60 MDa (megadaltons), implicado a patogenia da infecção (ATEBA; MBEWE, 2011; HEUVELINK et al., 1999; MENG; ZHAO; DOYLE, 1998; WANI et al., 2009; WONG; MACDIARMID; COOK, 2009).

2.5.2.2 Ecologia

Na doença do edema em leitões e na colite hemorrágica em terneiros, as *Shiga-like* toxinas têm sido consideradas como um agente causal dessas doenças (AGBODAZE, 1999). As cepas patogênicas da *E. coli*, ao aderirem e se multiplicarem no intestino delgado dos leitões susceptíveis, produzem SLT's, que são absorvidas. Dessa forma, vão para a corrente sanguínea, onde causam injúria vascular sistêmica, lesionando o endotélio e a túnica média de pequenas artérias e arteríolas por todo o corpo, o que leva ao surgimento de sinais clínicos de incoordenação motora e ataxia. O edema pode ser visto na face e pálpebras, com o animal ainda vivo e na necropsia, envolvendo órgãos

internos, como o intestino. A diarreia não é um sintoma comum (JONES; HUNT; KING, 2000; SOBESTIANSKY et al., 1999).

A colibacilose entérica complicada com choque também ocorre em suínos jovens, antes e após o desmame. As *E. coli* associadas a essa doença podem ser ETEC e, comumente, pertencem aos sorogrupos O149, O157 e S8 - que são F4 positivos, produzem enterotoxinas termoestáveis (ST-I e ST-II) e raramente toxinas termolábeis (LT-I), mas ocasionalmente produzem *Shiga-like* toxina (SLT-I) ou somente produzem SLT-I associados à doença do edema (FAIRBROTHER, 1999).

2.5.2.3 Prevalência

No Brasil, em estudo realizado no ano de 2001 em fezes diarreicas de 34 leitões com sintomas da doença do edema, foram encontradas 144 cepas de *E. coli*, sendo que em 99 estava presente o gene *stx2e* e, destas, 41 pertenciam ao sorogrupo O139 (SILVA, A. et al., 2001).

Na Dinamarca, a maioria das cepas ETEC e VTEC envolvidas em Doença do edema e nos casos de diarreia pós-desmame em suínos, pertencem a um limitado número de sorotipos, sendo o O149, o que prevalece encontrado em 49,9% das cepas analisadas. O O157 foi encontrado em 0,9% de 563 cepas de *E. coli* e a maioria de todos os isolados possuía atividade hemolítica (FRYDENDAHL, 2002).

A prevalência de *E. coli* O157:H7 foi maior em fezes de suínos que em de bovinos e humanos - resultado relatado em pesquisa realizada por Ateba e Bezuidenhout, em 2008, no sul da África - o que sugere que esses animais podem ser um risco à saúde humana, ao serem portadores desta cepa.

No Japão, 1,4% dos suínos amostrados de 35% das granjas do país possuíam a STEC O157:H7, carregavam os genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* e abrigavam o plasmídeo pO157 (NAKAZAWA; AKIBA; SAMESHIMA, 1999). Em estudo para determinação das variantes do gene *stx2* em cepas de STEC isoladas de pacientes humanos no Japão, as variantes foram agrupadas de acordo com a sequência de nucleotídeos da família da *Stx2* e verificou-se uma relação significativa entre *Stx2* e a HUS (NAKAO et al., 2002).

Em 2007 foi relatado um surto de *E. coli* O157, associado ao consumo de salame suíno, onde foram isolados os genes *stx1*, *stx2* e *eae* dos pacientes hospitalizados com colite hemorrágica e do salame consumido (CONEDERA et al., 2007). No ano de 2008, o CDC relatou

532 casos de *E. coli* O157:H7 nos EUA (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2008). O Brasil não dispõe de dados sistematizados para informação de número de casos de HUS ou de CH causada por cepas patogênicas de *E. coli* O157:H7.

2.5.2.4 Características culturais e identificação

O sorotipo O157:H7 é o único da maioria das cepas de *E. coli* que não fermentam o sorbitol dentro de 24 horas e não expressam a β -glucuronidase, encontradas em muitas cepas de *E. coli*. Desta forma, o Agar Sorbitol MacConkey (SMAC) tem sido eleito para o isolamento da O157:H7 em alimentos, adicionado de cefixime-telurito, com o objetivo de inibir outras cepas de *E. coli* e outras bactérias que não fermentam o sorbitol (MENG; ZHAO; DOYLE, 2001).

As cepas de *E. coli* O157:H7 são incapazes de multiplicar em temperaturas acima de 44 a 45,5°C; desta forma, são inibidas e não são detectadas nas análises de coliformes fecais pelo método do número mais provável, que utiliza a fermentação da lactose a 44,5°C como característica confirmativa, nem nas análises diretas de *E. coli*, utilizando substratos para a enzima β -glucuronidase (KORNACKI; JOHNSON, 2001; SILVA et al., 2003).

2.6 MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE CARÇAÇAS

Melhorar a qualidade microbiológica dos alimentos por meio de melhorias no processo tecnológico é insuficiente somente para garantir que doenças alimentares não cheguem ao consumidor, pois o processo tecnológico nem sempre garante a ausência de patógenos. Os alimentos podem facilmente ser recontaminados. Esforços devem ser feitos para cumprir rigorosamente as medidas de higiene, seguindo as Boas Práticas de Higiene (BPH) e as Boas Práticas de Fabricação (BPF), rigorosamente implementada na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), ao longo de toda a cadeia alimentar (PANISELLO et al., 2000). A descontaminação de carcaças é uma opção relevante nos casos em que a prevalência de patógenos nas carcaças deve ser reduzida a níveis que não são obtidos pela implementação de práticas de higiene no abate e intervenções em nível de produção primária (LAWSON et al., 2009).

Podem-se reduzir os níveis bacterianos no processo de abate com cuidados anteriores, por meio de dietas alimentares modificadas, por exclusão competitiva, utilizando-se bactérias benéficas ao animal, pelo

uso de tratamentos na água potável, pela administração oral de cloratos e pelo uso de vacinas. Após o abate também é possível, com técnicas de descontaminação, como depilação química, lavagem com água quente em temperatura >74 °C, pasteurização com vapor, aspiração com vapor, lavagens químicas com soluções de ácidos orgânicos e o uso de lactoferrina como antimicrobiano em alimentos (HUFFMAN, 2002; KOOHMARAIE et al., 2007).

Os surtos de *E.coli* O157:H7, nos Estados Unidos da América em 1993, iniciaram uma era de intensivos esforços para melhorar a qualidade sanitária da carne. Vários tipos de intervenções, como o uso de ácidos orgânicos, água quente, testes e retestes de amostras, além de irradiação, foram realizados para verificar o melhor e mais efetivo método de redução de micro-organismos patogênicos (KOOHMORAIE et al., 2005).

No início de 1996, o Departamento de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (FDA), aprovou o uso de cloreto de sódio acidificado como aditivo permitido para a redução de patógenos e para estender o tempo de prateleira de carnes vermelhas, aves e produtos do mar (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2011). Já na Comunidade Europeia, o uso de descontaminação de carne suína fresca não é comum. Durante muitos anos, a legislação do continente europeu limitou o uso de substâncias para a remoção superficial de produtos de origem animal. No entanto, atualmente, o Regulamento 853/2004 CE proveu a base legal para o uso de métodos físicos, como água quente ou vapor, como método de descontaminação (CODE...,2004b; HUGAS; TSIGARIDA, 2008).

No Brasil, o uso de substâncias químicas no processo de descontaminação microbiana de carcaças foi realizado até o ano de 2004 em abatedouros sob fiscalização federal do Ministério da Agricultura. Porém, tendo em vista a possibilidade de exportação de carcaças suínas para países membros da União Européia, e sendo esta prática condenada por estes países, no ano de 2004 o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura resolveu suspender tal prática, até que mais estudos sobre o assunto fossem realizados no Brasil (BRASIL, 2004). Em diversos países foram realizados estudos com o objetivo de verificar a eficiência da sanitização das carcaças de diversas espécies animais, sendo os ácidos orgânicos, acético e láctico os mais utilizados no processo de descontaminação e lavagem de carcaças, associados ou não ao uso de água quente e vapor (BOSILEVAC et al., 2006; CARPENTER; SMITH; BROADBENT, 2011; DORSA et al., 1995; EPLING;

CARPENTER; BLANKENSHIP, 1993; HARDIN et al., 1995; HUFFMAN, 2002; HWANG; BEUCHAT, 1995; NISSEN; MAUGESTEN; LEA, 2001).

2.6.1 Os ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos e seus sais são considerados ácidos fracos. Os ácidos acético, láctico, propiônico, benzoico e sórbico, que também são considerados ácidos fracos, são comumente utilizados na conservação de alimentos (DAVIDSON; TAYLOR, 2007), inibindo a multiplicação, reduzindo o número e a prevalência de patógenos, além da carga microbiana de carcaças (HUFFMAN, 2002).

A efetividade da atividade antimicrobiana tem relação com o pH e a forma não dissociada do ácido. Desta forma, o ácido não dissociado permeia através da membrana plasmática (lipolítica), penetrando na célula. A molécula do ácido se dissocia após entrar na célula, resultando em liberação de ânions e prótons, que acidificam o citoplasma celular e que devem ser expulsos para o exterior. Porém, a membrana é impermeável aos prótons que devem ser transportados ao exterior. Isto leva a célula ao desequilíbrio homeostático, cria um potencial eletroquímico através da membrana, altera o pH intracelular, inibe reações metabólicas essenciais e acumula substâncias tóxicas (DAVIDSON; TAYLOR, 2007; FORSYTHE, 2002).

Os ácidos orgânicos, para serem considerados seguros em sua utilização como antimicrobianos, devem atender a alguns requisitos: não podem ter uma ação permanente sobre a carne; a cor da carne fresca não deve ser preservada; o produto final deve apresentar indicadores de deterioração normal (por exemplo, descoloração); não deve haver extensão da vida útil em relação aos produtos elaborados a partir daquelas carnes sem tratamento; a composição nutricional da carne não deve ser afetada pelo tratamento - por exemplo: as proteínas não devem ser desnaturadas; as características sensoriais do produto não podem ser alteradas em relação ao produto final e, por fim, não deve haver quaisquer resíduos detectáveis do ácido orgânico no produto cárneo elaborado de carcaça tratada (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2011).

Os efeitos da descontaminação microbiológica de carcaças bovinas foram analisados por Gill e Landers (2003), utilizando 2 % de ácido láctico, lavagem das carcaças com água entre 40°C e 50°C e pasteurização com vapor ou água quente à 85°C, sendo este último considerado como mais eficiente na obtenção da máxima redução

bacteriana. Uma solução comercial de 5% de dióxido de cloro foi utilizada em superfície de carcaças suínas por Sardinha et al. (2001), e foi verificada a redução significativa de enterobactérias e da contagem total de bactérias aeróbicas. Da mesma forma, estudos realizados por Vasconcelos et al. (2002), com carne ovina, utilizando ácido acético a 1%, inibiu o crescimento de mesófilos, bolores e leveduras por duas semanas e de coliformes por seis semanas.

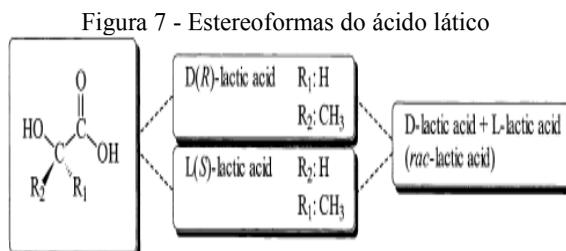
Estudos foram realizados por Stopforth et al. (2003), para avaliar a influência da concentração de ácidos orgânicos na sobrevivência de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 na água de lavagem de carcaças e em modelos de superfície de equipamentos. Eles demonstraram que o pH da água de lavagem, em torno de 4, foi letal para a *Listeria monocytogenes*, porém não para a *Escherichia coli* O157:H7.

Os ácidos orgânicos são excelentes antimicrobianos contra bactérias, entre elas está a *Salmonella*. Oferecem diversas vantagens como antimicrobianos porque são GRAS (*Generally Regarded as Safe* - Geralmente Considerados Seguros) para uso sem limitação, possuem baixo custo, são facilmente manipulados e provocam mínimas alterações sensoriais nos produtos (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012).

Recentes estudos sugerem que há influência do baixo pH atribuído aos ácidos orgânicos produzidos por bactérias probióticas na inibição da expressão do gene *stx2A* da *E. coli* O157:H7 (CAREY et al., 2008). Ao mesmo tempo, existe a preocupação de que os tratamentos descontaminantes possam levar ao incremento da tolerância após a adaptação ao estresse ambiental e os micro-organismos possam se tornar altamente resistentes a outras situações de estresse, resultando em um aumento da sobrevivência de patógenos nas carnes (STOPFORTH et al., 2003; SMIGIC et al., 2009). Para avaliar o impacto da descontaminação na saúde pública, alguns aspectos precisam ser considerados, como a prevalência dos patógenos nas carcaças, a distribuição do número de patógenos em cada carcaça, o limite de detecção para os métodos microbiológicos - que deve ser um número fixo ou a distribuição provável -, a dose infectiva e o tipo do patógeno e as condições ao longo da cadeia, que determinam a multiplicação, a sobrevivência ou a morte da bactéria após a descontaminação (HUGAS; TSIGARIDA, 2008).

2.6.2 O ácido láctico

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) (Figura 7) é um ácido monocarboxílico, com pKa 3.79, sendo um metabólito normal em seres humanos e animais. É oxidado através do piruvato, no citoplasma da célula, para dióxido de carbono e água no ciclo do ácido tricarboxílico, no interior da mitocôndria. É produzido naturalmente durante a fermentação de alimentos por bactérias ácido-láticas. O ácido láctico e seus sais são potentes desintegradores da membrana externa composta de lipopolissacarídeos (LPS), alterando a permeabilidade da barreira (DAVIDSON; TAYLOR, 2007).



Fonte: Sodergard e Stold (2002)

Nos EUA, o uso dessa substância é regulada pelo Serviço de Inspeção e Proteção aos Alimentos (FSIS), do Departamento da Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA), por meio da Diretiva FSIS 7120.1, revisão 11 de 4/6/2012, que estabelece limites de uso e aplicações. Ele pode ser utilizado em solução aquosa para aspersão, na concentração de até 5%, em carcaças antes ou após a refrigeração e em órgãos e carnes variadas. Essa diretiva também estabelece alguns requisitos necessários para que os ácidos orgânicos possam ser aprovados e utilizados nas indústrias (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2012).

Utilizar diluições baixas de ácido láctico, entre 1% a 2%, na linha de produção do abatedouro, pode auxiliar no processo de descontaminação de carcaças, sem afetar atributos de qualidade da carcaça suína (JAYAWARDANA et al., 2009; VAN NETTEN; MOSSSEL; HUIS, 1997).

A superfície externa da carcaça suína é coberta por pele contendo proteína estromática, principalmente colágeno, e gordura. Esses componentes são sem cor aparente e são na sua maioria brancos. A cor da pele na superfície da carcaça do suíno ao final da linha de abate, ou

seja, no momento da descontaminação, é de um branco- rosa- amarelo. Uma ligeira vermelhidão na pele pode ser devido a pigmentos heme a partir de resíduos de sangue. Podem ocorrer mudanças na cor da superfície de carcaças tratadas com ácido láctico e vapor, pela desnaturação das camadas superficiais da pele do suíno, seguida da oxidação dos pigmentos heme e as mudanças na hidratação das proteínas devido a redução do pH após tratamento com ácido láctico (PIPEK et al., 2005).

O ácido láctico a 2% e 5%, aplicado durante 60 segundos sobre a superfície da carcaça, eliminou *Salmonella typhimurium* de carcaças suínas inoculadas com $1 \log_{10}$ UFC/cm², mas não eliminou aquelas inoculadas com $2 \log_{10}$ UFC/cm² (VAN NETTEN MOSSEL; HUIS, 1995). A utilização de ácido láctico a 2%, associado à água à temperatura de 90°C a 95°C e 4 a 6 bar de pressão, foi eficiente em reduzir mesófilos e retardar o crescimento de psicotróficos (PIPEK et al., 2006).

O pH intracelular tem sido estudado como indicador do estado fisiológico das células bacterianas submetidas ao ácido láctico e a sua interferência na viabilidade celular após descontaminação (SMIGIC et al., 2009). A eficácia da lavagem de superfícies cárneas para descontaminação e inibição da multiplicação residual, com a utilização de 2% de ácido levulínico, ácido acético e ácido láctico, foi realizada em um estudo no qual se verificou, ao final, que não houve vantagem na redução de patógenos quando a lavagem foi realizada com ácido levulínico, comparado com o ácido láctico e acético (CARPENTER; SMITH; BROADBENT, 2011).

2.6.3 O vapor e a água quente

O processo de pasteurização consiste em expor a carcaça ou produtos cárneos ao vapor de água à temperatura entre 82°C a 97°C, dentro de uma cabine com pressão atmosférica durante 6 a 12 segundos. Normalmente, este tratamento inclui água renovável, a pasteurização com vapor e o resfriamento imediato. Em alguns equipamentos de vapor, a pressão pode ser combinada para melhorar a eficiência do tratamento. O processo industrial foi desenvolvido nos EUA e o tratamento de pasteurização de carcaças foi aprovado pelo FDA, em 1995, para todas as carcaças e partes de carcaças que fossem processadas. Essa tecnologia tem a vantagem de prover uma solução contínua e barata para a descontaminação de pequenos ou grandes pedaços de carne, em um curto espaço de tempo (AYMERICH; PICOUET; MONFORT, 2008).

A eficácia dos métodos utilizados para reduzir o número de bactérias na superfície das carcaças é influenciada pela pressão da água, temperatura, substâncias químicas presentes e sua concentração, tempo de exposição, métodos de aplicação, modelo da câmara de aplicação e estágio da aplicação (BELK, 2002; SOFOS; BELK; SMITH, 1998).

O processo de intervenção com água quente tem a vantagem de atingir uma consistente redução na contaminação bacteriana e requer menor manipulação da carcaça. A água quente utilizada à temperatura, variando entre 75°C a 85°C, por um período de tempo de 9 a 12 segundos de aplicação, sob pressão por aspersão sobre a carcaça, é eficiente para o processo de descontaminação (BOLTON; DOHERTY; SHERIDAN, 2001).

Em experimento conduzido com cento e quarenta e quatro carcaças bovinas, utilizou-se água quente à temperatura entre 74°C a 87,8°C, concluindo-se que esta medida pode ser uma efetiva intervenção para reduzir as bactérias na superfície das carcaças, pois houve redução de, aproximadamente, 1,7 log, quando comparado com o controle. Este dado demonstra que a lavagem com água quente pode ser uma boa estratégia e intervenção efetiva para reduzir bactérias nas superfícies de carcaças bovinas; especialmente, por produzir um baixo número de população bacteriana entre carcaças (REAGAN et al., 1996; KOOHMARAIE et al., 2005). Da mesma forma, Belk (2002) concluiu em seu trabalho que o uso de tratamentos combinados como: vapor, lavagem com ácidos orgânicos na pré-evisceração, pasteurização com água quente, uma segunda aplicação de ácidos orgânicos e lavagem final da carcaça, reduziu substancialmente a contagem bacteriana e a incidência de *Salmonella* sp., com redução de 14,7% para 1,9%.

O tratamento com spray de água quente durante as primeiras horas após o abate reduz significativamente a contagem total de bactérias aeróbicas, sem afetar a qualidade da carne suína (FERREIRA et al., 2004). Em carcaças suínas, a descontaminação com água quente resultou em maior redução no número de patógenos (GILL et al., 1995). Foram avaliadas as carcaças em um abate de trezentos e setenta e cinco suínos por hora, tratadas por 15 segundos com água a 80°C em cabine e houve a redução de mais de 2 logs no número de *E. coli*, enquanto a refrigeração reduziu apenas 0,7 logs (JENSEN; CHRISTENSEN, 2004).

2.7 MÉTODOS DE DETECÇÃO MICROBIOLÓGICA

A contagem de células viáveis, tanto nos alimentos quanto nas superfícies de contato com o ar em uma indústria de alimentos é um dos

parâmetros mais importantes na hora de se determinar a qualidade dos alimentos (SORRIBES, 2008).

Os métodos de detecção microbiológica são frequentemente categorizados em dois grupos: convencionais e rápidos. Contudo, os termos são mal aplicados, uma vez que alguns métodos rápidos necessitam de 24 horas para obtenção de seus resultados. “Convencional” refere-se a procedimentos que são comumente utilizados e costumam envolver homogeneização da amostra de alimento, preparação de uma série de diluições e inoculação em placas com ágar, específicas para a formação de colônias, e subsequente contagem. Esses métodos podem também ser referidos como “tradicionais”. Os métodos rápidos são alternativos aos convencionais e são projetados para obter o resultado final em menos tempo. Isso é altamente desejável na indústria de alimentos, apesar de as técnicas serem mais caras (FORSYTHE, 2002).

2.7.1 Método convencional ou tradicional

Os métodos convencionais, empregados atualmente em inúmeros laboratórios do mundo e estabelecidos como padrão de análises microbiológicas de alimentos, caracterizam-se por serem laboriosos, empregarem grandes volumes de meios de cultivo e requererem um tempo considerável para a obtenção de análises e resultados (SORRIBES, 2008).

O procedimento tradicional para contagem de micro-organismos envolve várias etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, homogeneização, diluição, plaqueamento em meio seletivo apropriado, incubação em temperatura apropriada por mais de 24 horas e contagem de colônias específicas, seguido dos procedimentos de testes bioquímicos, sorológicos e moleculares para caracterização (GE; MENG, 2009; OTERO; GARCÍA-LÓPEZ; MORENO, 1998). Para se detectar micro-organismos específicos, que muitas vezes são uma pequena proporção do total de micro-organismos presentes na amostra, meios seletivos são usados para aumentar a multiplicação do micro-organismos alvo e suprimir o restante (GE; MENG, 2009).

Nos métodos convencionais em que ocorre a contagem de colônias, o número de bactérias em um produto é determinado por inoculação de suspensão diluída da amostra sobre a superfície de um meio de crescimento sólido ou misturando a suspensão com o ágar liquefeito em placas de Petri. A contagem é concluída após incubação em períodos fixados e temperaturas que variam de 7 °C a 55 °C, em

atmosfera aeróbia, microaeróbia ou anaeróbia, dependendo do micro-organismos alvo. Durante a incubação, cada célula individual se multiplica em uma colônia visível a olho nu. Existe, no entanto, a possibilidade de as cepas de bactérias viáveis entrarem em dormência e se tornarem não cultiváveis, o que pode levar a uma subestimação do patógeno ou à falha no isolamento de patógenos em amostras contaminadas. Além disso, esses métodos requerem de dois a três dias para resultados iniciais e de sete a dez dias para confirmação (JASSON et al., 2010; VELUSAMY et al., 2010).

2.7.2 Métodos rápidos ou alternativos

Os microbiologistas iniciaram o desenvolvimento de métodos rápidos em meados dos anos 1960 e aceleraram o seu desenvolvimento a partir da década de 1970, devido à necessidade de se abreviar o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos e de se melhorar a produtividade laboratorial (FUNG, 2008).

Os métodos alternativos são definidos como aqueles de análises que demonstram ou estimam o mesmo analito (micro-organismos), medido pelo uso do método de referência correspondente (Ex.: AOAC International, FDA/BAM ou USDA) e que tenha os seguintes requisitos: rápida análise e/ou respostas, fácil de operar e/ou automação, performance analítica, no mínimo, tão boa quanto aquelas dos métodos de referência (FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002; LOMBARD; LECLERCQ, 2010).

Os métodos rápidos ou alternativos requerem um tempo reduzido para a obtenção dos resultados e permitem processar um número elevado de amostras por unidade de tempo; são, em geral, fáceis de usar, precisos (sensibilidade e especificidade adequadas e limites de detecção baixos) e economicamente rentáveis. Convém destacar que, na maioria dos casos, o emprego de métodos rápidos não exclui a etapa de enriquecimento do micro-organismo (ACHESON et al., 1996; BLACKBURN; MCCARTHY, 2000; SILVA et al., 2001), diante da necessidade de obter cultivos puros. Os resultados positivos obtidos de métodos alternativos (diferentes dos métodos de referência) também devem ser confirmados.

O Termo “Método Alternativo” refere-se à combinação de produtos, equipamentos e procedimentos completos de operação; da preparação da amostra ao resultado final (LOMBARD; LECLERCQ, 2010). Os métodos alternativos podem ser divididos em grupos, sendo que alguns sistemas utilizam um ou mais tipos de metodologia para

atingir o resultado final, sendo: (1) meios de cultura sólido, diferentes dos descritos na metodologia de referência; em sua maioria, baseados em substratos cromogênicos, tornando fácil o reconhecimento visual das bactérias alvo nas placas; (2) kits imunoenzimáticos, como o ELISA e (3) métodos moleculares, como sondas hibridizadas ou PCR, ambos convencionais ou *real time* (FUNG, 2008; LOMBARD; LECLERCQ, 2010; MOLDENHAUER, 2008; SORRIBES, 2008).

2.7.2.1 PETRIFILM™

O sistema Petrifilm™ da marca 3M™ é constituído por um sistema de filme duplo: uma base de cartão de papel quadriculado revestido de polietileno, recoberto por um meio de cultura desidratado que contém um agente geleificante solúvel em água fria, nutrientes e um filme superior transparente removível, que contém um indicador para atividade e contagem (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Os ingredientes variam de acordo com a placa, dependendo da cultura do micro-organismo. É um sistema de plaqueamento chamado *all-in-one* (Figura 8). Em vez de uma placa de Petri, a placa de Petrifilm™ faz uso de um fino filme plástico que carrega o meio de cultura (JASSON et al., 2010).

O sistema Petrifilm™ utiliza sais de tetrazólio como indicador, pois é um método alternativo indireto para medir atividade respiratória associada a uma cadeia de transporte de elétrons. A redução do sal pela enzima mitocondrial succinato – desidrogenase leva a formação de um precipitado insolúvel de cor intensa, conhecido como Formazán. Os sais de tetrazólio: cloreto de trifetil tetrazolium (TTC) e cloreto de iodo-nitrofenil tetrazólio (INT) são utilizados frequentemente, dada a rapidez com que são reduzidos pela maioria dos sistemas desidrogenases. A transformação se realiza somente em células vivas e a quantidade do composto produzido é proporcional ao número de células presentes (ORDÓÑEZ, 2001).

A Association Official Analytical Chemists (2002) reconhece a placa de Petrifilm™ AC, CC, RCC, HSCC, EC, YM, RSA, como método oficial. A Association Française de Normalisation (AFNOR) também valida como oficial as placas de Petrifilm™ AC, EB, CC, RCC, HSCC, EC, RSA (AFNOR VALIDATION, 2011). No Brasil o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento reconhece a placa Petrifilm™ EC para produtos de origem animal (BRASIL, 2005).

Figura 8 - Sistema Petrifilm™ com meio de cultura desidratado com agente geleificante e filme superior transparente removível



Fonte: Cattani (2011)

a) PETRIFILM™ para contagem de aeróbios

A placa Petrifilm™ para Contagem de aeróbios (AC) é um sistema pronto de meio de cultura que contém os nutrientes do ágar padrão de contagem, um agente geleificante solúvel em água fria e um indicador tetrazólico para facilitar a contagem das colônias. Como ocorre nas placas convencionais, a faixa de contagem de colônias nas placas Petrifilm™ é de vinte e cinco a duzentos e cinquenta colônias, sendo contadas todas as colônias vermelhas, independente de seu tamanho ou intensidade de cor (3M™ Company, St. Paul, MN, USA).

As amostras a serem testadas devem ser preparadas com o uso de diluentes apropriados como tampão fosfato de Butterfield, água peptonada 0,1%, diluente salina peptonada (método ISO 6887), água peptonada tamponada (método ISO 6579), solução salina (0,85-0,90%), caldo letheen sem bissulfito de sódio e água destilada. A amostra, diluída ou não, é inoculada na superfície do filme base no volume de 1 ml e o filme superior é sobreposto. Com o auxílio de um difusor plástico, a amostra é espalhada em uma área de crescimento de 20cm². Após a solidificação da substância geleificante, o conjunto é incubado à temperatura e no tempo indicados pelo fabricante, de acordo com o micro-organismos alvo. Após a incubação, as colônias visíveis são contadas e o resultado é expresso em UFC/ml (ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2002).

Em estudo realizado para verificar contagens de aeróbios em sorvete, os resultados permitiram concluir que: os sistemas Petrifilm™ e Simplate® não apresentaram diferença significativa entre si, nem em relação aos demais métodos de contagem, podendo ser utilizados como

uma alternativa tecnicamente viável para a contagem padrão em placa, em amostras de sorvete (SANT'ANA; CONCEIÇÃO; AZEREDO, 2002).

b) PETRIFILM™ para contagem de *Enterobacteriaceae*

A placa Petrifilm™ para contagem de *Enterobacteriaceae* (EB) é um sistema pronto de meio de cultura que contém nutrientes modificados de vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG), um agente gelificante solúvel em água fria e um indicador tetrazólico para facilitar a contagem das colônias. Como ocorre nas placas convencionais, a faixa de contagem de colônias nas placas Petrifilm™ é de quinze a cem colônias, sendo contadas todas as colônias que produzem ácido e/ou gás, vermelhas com zonas amarelas e/ou colônias vermelhas com bolhas de gás com ou sem zonas amarelas (3M™ Company, St. Paul, MN, USA).

Em estudos realizados, a contagem média em log₁₀ e a precisão de repetibilidade estimada do método Petrifilm™ EB foram similares àquelas pelo método VRBG e melhores que aquelas pelo método NMP (SILBERNAGEL; LINDBERG, 2002; 2003).

c) PETRIFILM™ para contagem de *Escherichia coli*

A placa Petrifilm™ para Contagem de *Escherichia coli* (EC) é um sistema pronto de meio de cultura que contém os nutrientes do ágar vermelho violeta bile (VRBA), um agente gelificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glucuronidase (5-bromo-4cloro-3indolil-β-D-glicuronídeo) e um indicador tetrazólico. As placas Petrifilm™ EC são utilizadas para a contagem de *E. coli* e coliformes. A faixa de contagem ideal de colônias nas placas Petrifilm™ EC é de quinze a cento e cinquenta colônias. Coliformes produzem colônias vermelhas associadas às bolhas de gás e a *Escherichia coli* produz colônias azuis associadas às bolhas de gás. A glicoronidase produzida pela *Escherichia coli* reage com o corante indicador na placa, formando um precipitado azul em torno da colônia. Colônias não coliformes são vermelhas, mas não são associadas às bolhas de gás (3M™ Company, St. Paul, MN, USA).

Em estudo realizado por Silva et al. (2006), o Petrifilm® EC mostrou-se sensível e eficiente para detecção de *E. coli* em alimentos, quando comparado com o método convencional de tubos múltiplos, além de apresentar vantagens, tais como: rapidez na obtenção de resultados, praticidade na execução e na contagem de colônias e

possibilidade de identificação bioquímica complementar no máximo 48h após incubação.

As correlações encontradas entre as contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes nos sistemas Compact dry® e Petrifilm™ EC e a metodologia tradicional indicam que os resultados obtidos através desses métodos rápidos são equivalentes aos obtidos pelo método de referência, e que podem ser usados como alternativas viáveis nas análises microbiológicas de carne moída bovina, sem comprometer a confiabilidade e a sensibilidade (CASAROTTI; PAULA; ROSSI, 2007).

O Petrifilm™ EC foi comparado ao método australiano para enumeração de coliformes e *E. coli* e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os métodos, exceto que a contagem de *E. coli* foi maior pelo método de plaqueamento direto com uma etapa de ressuscitação do que na contagem pelo método Petrifilm™ (BLOCH et al., 1996).

2.7.2.2 TEMPO®

TEMPO® é um sistema miniaturizado que surgiu a partir do conceito da placa microtituladora (96 poços, formato 8x12), que permite reduzir o volume reativo e o meio a ser empregado nos ensaios. É baseado no metabolismo de substratos específicos produzidos pelos micro-organismos e sua detecção mediante diversos sistemas indicadores (SORRIBES, 2008). Foi desenvolvido para a enumeração de indicadores de qualidade microbiológica em produtos alimentícios (KUNICKA, 2007).

O teste consiste em um frasco contendo meio de cultura e um cartão, específicos do teste (Figura 9). Equipamentos dedicados e programas específicos foram desenvolvidos para leitura final da amostra. O processo inicia-se a partir da suspensão da amostra a ser testada, que será inoculada no frasco do meio de cultura. O inoculado é transferido para os cartões que contêm três séries de dezesseis poços (de tamanho pequeno, médio e grande): 225 µl no primeiro poço, 22,5 µl no segundo poço e 2,25 µl no terceiro, com uma diferença de volume de 1 log entre cada série de poços. O cartão simula o método NMP, utilizando dezesseis replicatas ao invés de três a cinco, do método convencional, reduzindo a incerteza e permitindo acurada quantificação. O cartão é, então, hermeticamente selado, impedindo qualquer risco de contaminação. O micro-organismos alvo multiplica-se no meio de cultura, resultando num sinal detectado pela leitora do equipamento,

chamada TEMPO® Reader (baseado na fluorescência do pH indicador, atividade da β - glucuronidase etc.). A enumeração varia de 10 a 49.000 UFC/ml ou de 100 a 490.000 UFC/ml, dependendo do protocolo (JASSON et al., 2010; OWEN; WILLIS; LAMPH, 2010).

O sistema TEMPO® oferece uma importante economia pela padronização das análises e minimização do tempo de treinamento, o volume de resíduos e o número de operações. Estudos de fluxo de trabalho demonstraram uma redução de duas a três vezes no tempo de manipulação da amostra com a utilização do TEMPO®, em comparação com o método de referência ISO (SOHIER; RANNOU; GORSE, 2006; CATTAPAN; VILLARD; DUMONT, 2009).

Figura 9 - Transferência do inóculo para os cartões do sistema TEMPO®



Fonte: Association Official Analytical Chemists Research News (2009)

a) TEMPO® TVC

O TEMPO® TVC foi validado e certificado pela AOAC *Research Institute*, como um método efetivo para a enumeração total de bactérias aeróbias em uma variedade de alimentos, incluindo carne suína crua, carne bovina crua, produtos cárneos cozidos e defumados, entre outros produtos (CROWLEY et al., 2009; JOHNSON; MILLS; BEZZOLE, 2008).

Os micro-organismos aeróbios presentes na amostra hidrolisam o substrato do meio de cultura durante a incubação, produzindo um sinal fluorescente por liberação da molécula 4-MU (metil umbelliferone) no meio (CROWLEY et al., 2009).

Diversos estudos foram realizados para avaliação do TEMPO® TVC, expressando uma boa correlação entre ele e o método de referência ISO (GREEN et al., 2011; VERSETTI et al., 2011).

b) TEMPO® EB

O meio de cultura do TEMPO® EB contém uma molécula fluorescente, o 4-metil umbelliferone (4MU), indicadora de pH (JOHNSON et al., 2008). Quando o pH está neutro, há emissão de fluorescência. A *Enterobacteriaceae* presente no cartão assimila os nutrientes do meio de cultura durante a incubação, resultando em um incremento do pH. Quando ocorre a fermentação da glicose pelas *Enterobacteriaceae* há acidificação do reagente, que resulta em extinção da fluorescência em tubos com reação positiva (CÓLON-REVELES et al., 2007; JOHNSON; MILLS; BEZZOLE, 2009; OWEN; WILLIS; LAMPH, 2010).

Em estudo realizado em alimentos e produtos lácteos, não foram encontradas diferenças significativas entre o TEMPO® EB, a técnica NMP e o plaqueamento para a enumeração de *Enterobacteriaceae*, sendo demonstrada vantagem na utilização do TEMPO® EB, bem como equivalência nos resultados encontrados (OWEN; WILLIS; LAMPH, 2010). O método foi validado pela AOAC após estudos que demonstraram que ele é estatisticamente equivalente ao método de referência (JOHNSON; MILLS; BEZZOLE, 2009).

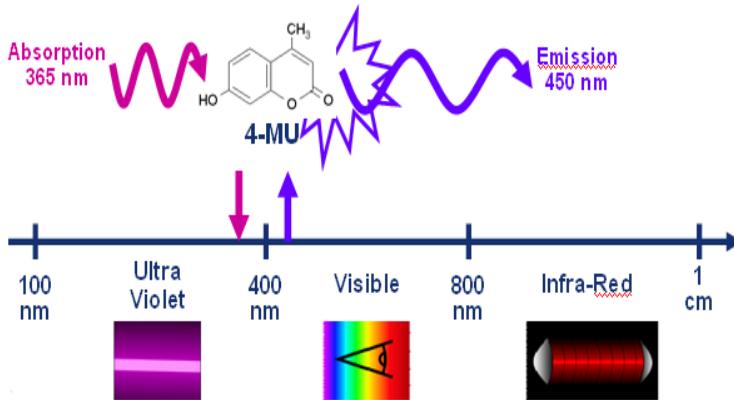
c) TEMPO® EC

O TEMPO® EC possui, no meio de cultura, o substrato fluorogênico, 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronideo (MUG), que é clivado pela enzima β -glucuronidase, produzida pela maioria das cepas da *E. coli*. A molécula clivada, 4-MU, produz fluorescência (Figura 10), que é detectada pelo TEMPO® Reader (CROWLEY et al., 2010).

Em estudo realizado por Torlak, Akan e Gokmen (2008), o TEMPO® EC foi claramente preferível em relação ao meio TBX, especificamente para amostras que incluem baixos níveis de contaminação e células estressadas pelo frio, demonstrando ser um método adequado e alternativo para a contagem padrão em placa para enumeração de *E. coli*, apresentando um alto coeficiente de correlação nos resultados encontrados.

Em estudos de enumeração de *E. coli*, descrita no processo de validação pela AOAC *Research Institute*, o método do TEMPO® EC demonstrou ser estatisticamente equivalente ao método de referência (JOHNSON, 2007).

Figura 10 - Fluorescência emitida após clivagem do MUG no Sistema TEMPO®



Fonte: BioMerieux (2008)

2.7.2.3 VIDAS E. COLI O157 (VIDAS ECO)

O Sistema VIDAS® (bioMerieux, Marcy-I'Étoile, France) é um sistema baseado na técnica de ELISA, que detecta micro-organismos como a *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, entre outros. O ensaio imunoenzimático (ELISA) é um sistema de detecção que usa anticorpos monoclonais sobre placas para capturar o antígeno alvo. O antígeno capturado é então detectado, usando um segundo anticorpo que pode estar conjugado a uma enzima. A adição de um substrato fluorescente facilita a visualização do antígeno alvo. Esse método oferece especificidade e automação potencial (FORSYTHE, 2002; REITER et al., 2010).

O VIDAS® *E. coli* O157(VIDAS® ECO) é um teste qualitativo, automatizado nos sistemas VIDAS® , que permite a detecção de *Escherichia coli* de sorotipo O157 nos produtos de alimentação humana pela técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), Ensaio Imunoenzimático Fluorescente. O sistema pode analisar doze amostras simultaneamente após o primeiro ensaio, quando o equipamento é calibrado utilizando-se um calibrador identificado como S1 que será analisado em duplicata, um controle positivo (C1) e um controle negativo (C2). O calibrador deve estar compreendido nos limites RFV ("Relative Fluorescence Value") fixados (bioMerieux, Marcy-I'Étoile, France). Para ELISA, o limite de detecção típico é de 10^5 células/ml (BLACKBURN; MCCARTHY, 2000).

O barrete utilizado no sistema, é composto por dez poços cobertos com uma folha de alumínio selada e etiquetada, onde se encontra um código de barras com a informação relativa ao código de teste, o número de lote e a data de validade da embalagem. No VIDAS® ECO, o cone (SPR®), de utilização única, serve tanto de fase sólida como de suporte de pipetagem. O interior do cone está coberto com uma proteína recombinante de fago que permite a captura das *E. coli* O157:H7 (BIOMERIEUX, 2008).

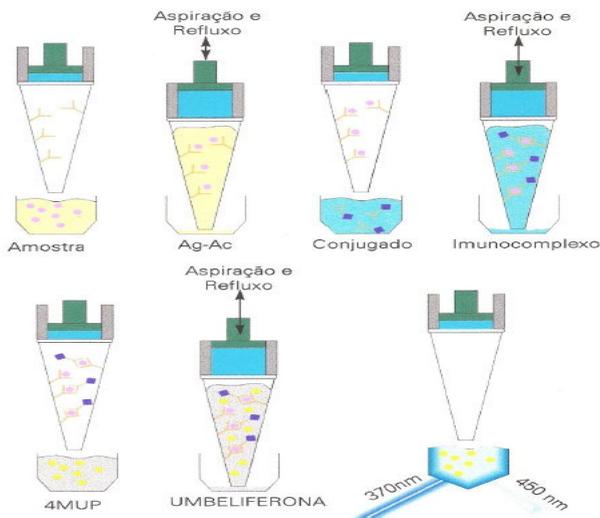
Todas as etapas do teste são efetuadas automaticamente pelo aparelho e constituídas por uma sucessão de ciclos de aspiração e dispersão do meio reacional. As *E. coli* O157:H7 presentes são capturadas pela proteína recombinante do fago fixado no interior do cone. Os elementos que ficam livres são eliminados por lavagem. Em seguida, o conjugado com fosfatase alcalina é aspirado pelo cone e vai fixar-se às *E. coli* O157:H7, que já estão fixas à proteína de fago da parede do cone. As novas etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado. Na etapa final de revelação, o substrato 4-metilumbeliferilfosfato é aspirado e dispensado no cone; a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato em 4-Metil-umbeliferona, cuja intensidade da fluorescência emitida é medida por meio de um scanner ótico a 450 nm no VIDAS® e o valor é expresso em RFV (Valor relativo de fluorescência). Terminado o teste, os resultados são analisados automaticamente pelo aparelho que fornece um valor de teste para cada amostra. Este valor é comparado com as referências internas (limiares) e cada resultado é interpretado (positivo, negativo). Os valores são interpretados e expressados da seguinte forma: valor do teste < 10 = interpretação negativa; valor do teste > 10 = interpretação positiva. Um resultado com um valor de teste inferior ao valor limiar indica uma amostra que não contém antígenos O157 ou que contém uma concentração de antígenos O157 inferior ao limite de detecção. Um resultado com um valor de teste superior ou igual ao valor limiar indica uma amostra contaminada com *E. coli* O157. Neste caso, os resultados devem ser confirmados pelo método convencional em Caldo Mac Conkey com cefixima e Telurito de potássio (CT-MAC). O Agar Sorbitol Mac Conkey adicionado de cefixima e Telurito de potássio utiliza em sua composição o sorbitol no lugar da lactose, sendo mais seletivo com concentração menor de sais biliares e cristal violeta para inibição de bactérias Gram positivas, principalmente *Enterococcus* e *Staphylococcus*, e também de espécies de *Proteus* (BIOMERIEUX, 2008).

Na execução do teste VIDAS ECO podem ocorrer reações cruzadas entre os anticorpos do teste com estirpes/cepas que possuem antígeno O157, que não *E. coli*, tais como algumas *Salmonella* do grupo N, algumas *Citrobacter*, *M. organii* e *E. cloacae* (DE BOER; HEUVELINK, 2000; HUANG et al., 2005).

Huang et al. (2005) e Reiter et al. (2010) realizaram estudos comparativos entre o sistema VIDAS® e outros métodos alternativos em relação ao método tradicional, com micro-organismos diversos e em diferentes amostras de alimentos. Verificou-se um melhor desempenho e efetividade diagnóstica pelo sistema VIDAS®, em comparação com os demais métodos testados.

O teste VIDAS ECO foi validado pela Association Française de Normalisation (AFNOR) - BIO 12/08 – 07/00, em 5 de Julho de 2000, para todos os produtos alimentares; pela AOAC RI Método testado de performance N° 010504 para carne bovina picada e pelo Governo Chinês SN/T 0184.1 (AFNOR, 2011; ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2002). A reação antígeno-anticorpo no sistema VIDAS® ECO pode ser observada na Figura 11.

Figura 11 - Captura do antígeno presente na amostra; o Ac se liga ao Ag; um segundo anticorpo conjugado a uma enzima forma o imunocomplexo; A adição de um substrato fluorescente o 4MUP facilita a visualização do antígeno alvo e formação da umbeliferona; leitura d



3 AVALIAÇÃO DA INFLUENCIA DO ÁCIDO LÁTICO E DA ÁGUA QUENTE NA DESCONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM CARÇAÇAS SUÍNAS NO BRASIL

Para aprimorar a condição sanitária industrial e com o objetivo de aumentar a segurança microbiológica e a higiene do processo de abate, houve a obrigatoriedade a partir do ano de 1997 dos estabelecimentos de abate que funcionavam seguindo as normas do Serviço de Inspeção Federal no Brasil para a produção de carne e produtos de origem animal implantarem programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BRASIL, 1997) e programas de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (BRASIL, 1998).

Entretanto, a condição sanitária do suíno antes do abate, principalmente em relação à *Salmonella* spp., é um fator que contribui para a contaminação bacteriana da carcaça durante os procedimentos de inspeção sanitária, devido aos cortes realizados nos linfonodos e concomitante manipulação dos órgãos abdominais e vísceras, levando à contaminação cruzada das carcaças no abate (BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004; HUMPHREY; JORGENSEN, 2006; OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2009). Desta forma torna-se necessário adotar medidas de controle para prevenir a disseminação dos patógenos presentes nos animais abatidos para o homem (NESBAKKEN; SKJERVE, 1996; SOFOS; BELK; SMITH, 1999).

Métodos de descontaminação bacteriana em carcaças podem ser necessários como uma efetiva intervenção, no sentido de reduzir a contaminação após o abate (SWANENBURG et al., 2001). Esses processos de descontaminação baseados em imersão, lavagem ou aspersão de água ou soluções químicas, lavagem com água quente em temperatura superior a 74°C, pasteurização com vapor, aspiração com vapor, lavagens químicas com soluções de ácidos orgânicos (HUFFMAN, 2002; KOOHMARAIE et al., 2005) são utilizados em diversos países, como EUA, Canadá e Austrália (SOFOS; BELK; SMITH, 1999). Desta forma, a descontaminação de carcaças é uma opção relevante nos casos em que a prevalência de patógenos nas carcaças deve ser reduzida a níveis que não são obtidos pela implementação de práticas de higiene no abate e também pelas intervenções em nível de produção primária (LAWSON et al., 2009).

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência do uso de ácido lático e da água de lavagem sobre a população microbiana naturalmente presente na superfície de carcaças suínas no Estado de Santa Catarina, Brasil.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de março de 2010 a março de 2011, foram analisadas 152 amostras procedentes de 76 carcaças suínas coletadas no final da linha de um abatedouro sob Inspeção Federal, no Estado de Santa Catarina, com abate diário de 4.500 suínos.

3.1.1 Amostras

Cada amostra foi constituída de swabs de esponja coletadas em quatro pontos da carcaça (pernil, barriga, lombo e papada). Os quatro swabs de esponja juntos (100 cm² cada) representam a amostragem de uma área correspondente a 400 cm². As amostras das superfícies das carcaças foram coletadas pressionando-se a esponja, previamente umedecida em 100 mL de solução salina peptonada 0,1% estéril, sobre moldes delimitadores esterilizados, na área a ser amostrada (100 cm²) por cerca de 20 segundos, iniciando o procedimento no sentido vertical, depois esfregando horizontalmente e, por fim, no sentido diagonal. A esponja foi acondicionada em um saco de stomacher estéril e mantida sob refrigeração à 4 °C até o momento da análise no laboratório, que não ultrapassou 24 horas da coleta.

A coleta foi realizada antes e 12 horas após a aplicação dos seguintes tratamentos: tratamento zero (T0), aspersão de água em temperatura ambiente; tratamento 1 (T1), aspersão de água com temperatura entre 76°C e 78°C, tratamento 2 (T2), água com temperatura entre 76°C e 78°C seguido de aspersão com ácido láctico na concentração de 1,5%; tratamento 3 (T3), água à temperatura ambiente seguido de aspersão de ácido láctico na concentração de 1,5%. As carcaças se encontravam sob refrigeração no momento da coleta realizada 12 horas após os tratamentos.

3.1.2 Metodologia utilizada para aspersão de água e ácido láctico

Para aspersão de água na superfície das carcaças foi utilizado o chuveiro final da linha de abate, com dimensões de 3 metros de comprimento, com 3 metros de altura e 1,15 metros de largura no interior; e com 67 cm na entrada do chuveiro. A água do chuveiro é automaticamente acionada por sensor durante 5 segundos, sendo aspergida por meio de três fileiras de bicos aspersores (14 bicos na primeira fileira, 20 bicos na segunda fileira e 10 bicos na terceira fileira), totalizando 44 bicos aspersores, sob pressão de 2,2 Kgf/cm².

A água utilizada se encontrava na temperatura entre 14°C e 25°C para o T0 e T3. A água aquecida utilizada no experimento para T1 e T2, foi aquecida até 86°C no interior da caixa d'água e chegou aos bicos aspersores do chuveiro final entre 76°C a 78°C.

A solução de ácido láctico a 1,5% em temperatura ambiente, foi aspergida por pulverizador costal manual. O bico aspersor manteve a pressão de saída constante em torno de 2 Kgf/cm² e vazão de 300 ml/minuto.

Utilizou-se ácido láctico natural L(+) produzido pela fermentação da cana de açúcar, com concentração de 84,5-85,5%, marca PURAC®. Foi utilizado 150 mL de ácido láctico, adicionado a água em quantidade suficiente para 10 litros de solução, e que manteve o pH em torno de 2,5, sendo controlada com pHmetro. As carcaças foram aspergidas manualmente durante 3 minutos em média, com um volume de aproximadamente 900 mL de solução por carcaça, formando-se um filme uniforme da solução sobre a superfície da carcaça. As carcaças que receberam este tratamento foram aspergidas logo após o chuveiro final na linha de abate, localizado antes da entrada no choque térmico e das câmaras de refrigeração.

As carcaças foram submetidas a análise sensorial após alcançarem a temperatura de 7°C.

3.1.3 Metodologia utilizada para os ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos para análise de micro-organismos aeróbios mesófilos, enterobactérias, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *E. coli* O157, foram realizados de acordo com a metodologia descrita no American Public Health Association (APHA) (ANDREWS et al., 2001; KORNACKI; JOHNSON, 2001; MENG; ZHAO; DOYLE, 2001).

As cepas de *Salmonella* spp. foram tipificadas pela técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) no Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ).

Amostras da água utilizada na lavagem das carcaças foram coletadas em todos os dias do experimento, e analisadas para contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos, enterobactérias, *E. coli* e *Salmonella* spp.

3.1.4 Análise Estatística

Os dados referentes aos micro-organismos pesquisados foram analisados estatisticamente pelo programa STATÍSTICA 7.0, sendo

realizada Análise de variância, a nível de 95% de confiança (ANDRADE; OGLIARI, 2007). As contagens em UFC/cm² dos micro-organismos aeróbios mesófilos, enterobactérias e *E. coli* foram transformadas em log₁₀ para efetuar-se a redução. Valores de log negativos expressam contagens menores ou iguais a zero.

3.2 RESULTADOS

Na tabela 1 são apresentados os resultados dos ensaios microbiológicos realizados para *Salmonella* spp., *E. coli* e enterobactérias, nas carcaças suínas antes e depois dos tratamentos realizados.

Tabela 1 - Prevalência de carcaças suínas detectadas positivas para *Salmonella* spp., *E. coli* e Enterobactérias, analisadas antes e após a aplicação dos tratamentos com água e ácido láctico a 1,5% (T0,T1,T2,T3)

Micro-organismo	Fase do Tratamento	Numero de carcaças positivas				
		T0	T1	T2	T3	Total
<i>Salmonella</i>	Antes	1	1	0	1	3 / 76
	Depois	0	1	1	0	2 / 76
<i>E. coli</i>	Antes	8	8	5	10	31 / 76
	Depois	5	5	0	3	13 / 76
Enterobactérias	Antes	11	15	9	9	44 / 76
	Depois	8	8	0	8	24 / 76

Fonte: Dados do autor

Nota:T0, água em temperatura ambiente ; T1, água com temperatura entre 76°C e 78°C ; T2, água com temperatura entre 76°C e 78°C seguido de aspersão com ácido láctico na concentração de 1,5% ; T3, água à temperatura ambiente seguido de aspersão de ácido láctico na concentração de 1,5%.

A *Salmonella* spp. foi detectada em 5 das 76 carcaças amostradas, representando uma prevalência de 6,58% sobre a amostra. As cepas de *Salmonella* spp. foram identificadas e pertenciam a três sorovares destacando-se *Salmonella* Thyphimurium (2/5), *Salmonella* Agona (2/5) e *Salmonella* Derby (1/5). Não foi possível avaliar estatisticamente o efeito dos tratamentos na descontaminação das carcaças naturalmente contaminadas com *Salmonella* spp. devido a baixa frequência de carcaças encontradas com o patógeno.

A frequência de *Salmonella* spp. encontrada antes do tratamento pouco diferiu da frequência encontrada depois do tratamento (1,02%) e

a prevalência de *E. coli* nas carcaças foi reduzida em 32,68% após os tratamentos e para enterobactérias a redução após os tratamentos foi de 26,31%.

As contagens de *E. coli* variaram de $0,1 \cdot 10^1$ UFC/cm² a $9,2 \cdot 10^1$ UFC/cm² antes dos tratamentos e de $0,1 \cdot 10^1$ UFC/cm² a $0,9 \cdot 10^1$ UFC/cm² depois dos tratamentos, e as contagens de enterobactérias variaram de $0,1 \cdot 10^1$ UFC/cm² a $1,3 \cdot 10^3$ UFC/cm² antes dos tratamentos e de $0,1 \cdot 10^1$ UFC/cm² a $2,2 \cdot 10^2$ UFC/cm² depois dos tratamentos. O tratamento que demonstrou redução de 100% no número de carcaças positivas em relação a *E. coli* e enterobactérias foi o tratamento 2 que utilizou água com temperatura entre 76 °C e 78 °C seguido de aspersão com ácido lático na concentração de 1,5%.

Foram analisadas as diferenças entre os resultados de contagem inicial e final de mesófilos, enterobactérias e *E. coli* após os tratamentos realizados. Na tabela 2 estão descritos os valores médios encontrados na contagem inicial (antes do tratamento) e final (depois do tratamento) para cada micro-organismo pesquisado, e a redução dos mesmos após os tratamentos.

Tabela 2 - Média de contagem de micro-organismos Mesófilos aeróbios, enterobactérias, *E. coli*, inicial (antes do tratamento), final (depois do tratamento) e a redução alcançada após a aplicação dos tratamentos para descontaminação de carcaças suínas

Micro-organismos	Estágio da operação	Tratamentos			
		T0	T1	T2	T3
		Média	Média	Média	Média
Mesófilos	Antes	3,68 ^a	3,91 ^a	3,79 ^a	3,79 ^a
	Depois	3,05 ^b	3,01 ^b	2,92 ^b	3,21 ^b
	Redução	0,67	0,96	0,92	0,54
<i>E. coli</i>	Antes	0,48 ^c	0,43 ^c	0,02 ^c	0,30 ^c
	Depois	0,19 ^d	0,01 ^d	-0,04 ^d	-0,01 ^d
	Redução	0,33	0,47	0,07	0,31
Enterobactérias	Antes	0,59 ^e	0,76 ^e	0,28 ^e	0,30 ^e
	Depois	0,49 ^f	0,22 ^f	-0,04 ^f	0,23 ^f
	Redução	0,09	0,54	0,32	0,07

Fonte: Dados do autor

Nota: água em temperatura ambiente (T0); água com temperatura entre 76°C e 78°C (T1); água com temperatura entre 76°C e 78°C seguido de aspersão com ácido lático na concentração de 1,5% (T2), água à temperatura ambiente seguido de aspersão de ácido lático na concentração de 1,5% (T3).

A maior redução obtida para micro-organismos aeróbios mesófilos foi com o tratamento 1 (água com temperatura entre 76°C e 78°C) que reduziu 0.96 log UFC/cm² da contagem total de micro-organismos mesófilos, seguido do tratamento 2 (água com temperatura entre 76°C e 78°C seguido de aspersão com ácido láctico na concentração de 1,5%) que reduziu 0.92 log UFC/cm², porém estatisticamente não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) na redução dos micro-organismos com os tratamentos testados. Todas as carcaças amostradas foram prevalentes antes e depois dos tratamentos para os micro-organismos mesófilos sendo que as contagens variaram de 3,5. 10² UFC/cm² até 1,0. 10⁵UFC/ cm² antes dos tratamentos e de 1,8. 10¹ UFC/cm² até 1,8.10⁴ UFC/ cm² depois dos tratamentos.

Não houve amostra positiva para *E. coli* O157, não sendo possível avaliar o efeito dos tratamentos sobre esse micro-organismo.

Todos os resultados das análises da água utilizada no estudo foram negativos para *Salmonella* spp. e apresentaram contagens menores que 1 UFC/mL para micro-organismos mesófilos, enterobactérias e *E. coli*.

Na verificação sensorial, não houve alteração de coloração na pele das carcaças nos diferentes tratamentos aplicados.

Não houve diferença estatística com nível de significância de 95% para nenhum dos tratamentos utilizados nesse experimento com referencia a redução microbiana em ciclos logarítmicos.

3.3 DISCUSSÃO

Neste estudo, a eficácia da água quente, ácido láctico a 1,5%, e água quente seguida da aspersão de ácido láctico a 1,5% para a descontaminação de carcaças suínas foram comparadas. Os tratamentos foram aplicados utilizando-se a estrutura da planta processadora, sem alteração de fluxo ou equipamento do abatedouro. Devido não haver estudos com uso de descontaminantes em carcaças suínas no Brasil, a discussão dos resultados encontrados torna-se um pouco difícil, e algumas discussões se referem a estudos realizados em cortes suínos ou em carcaças bovinas.

A redução de micro-organismos mesófilos naturalmente presentes na superfície de carcaças suínas, verificada neste trabalho, foi de aproximadamente um ciclo logarítmico, após o T1 e o T2, e foi abaixo da redução encontrada por Reagan et al. (1996) e por Gill et al. (1995) de dois ciclos logarítmicos. Reagan et al. (1996) concluiu que a água quente de 74°C a 87,8°C (durante 18 segundos e pressão de

2,4kPa) aplicada sobre a superfície de carcaças bovinas artificialmente contaminadas foi eficiente em reduzir a contaminação em 2 ciclos logarítmicos de mesófilos e reduziu significativamente a incidência de *Salmonella* spp., porém aspectos como tempo de exposição e pressão dos bicos aspersores devem ser levados em conta, pois tem um substancial impacto na magnitude da redução microbiana.

Da mesma forma Gill et al. (1995), em seu experimento de descontaminação de suínos com água quente a variadas temperaturas, em um estabelecimento comercial, concluiu que aspergir água em temperatura de 85°C durante 20 segundos reduziu a contagem total de bactérias em dois ciclos logarítmicos. Gill e Landers (2003), estudando diversos tratamentos de descontaminação de carcaças concluíram que aspergir as carcaças com 2% de ácido láctico não foi tão efetivo quanto aspergir água a temperatura de 85°C durante 10 segundos e com pressão nos bicos aspersores de 20kg/cm².

Em estudo realizado por Lawson et al. (2009), o tratamento com água a 80°C durante 15 segundos foi o método mais efetivo para reduzir *Salmonella* spp. e *Yersinia* spp. da superfície de carcaças suínas. Em nosso estudo, o tempo de exposição de 5 segundos utilizado no chuveiro final de lavagem de carcaças, e a pressão dos bicos aspersores que estava em torno de 2,2 Kgf/cm² (abaixo dos 3 Kgf/cm² recomendado pela legislação brasileira), demonstrou ser pouco eficiente para a redução e remoção física de micro-organismos.

O tratamento 1 (T1) que utilizou água quente, e logo após ao tratamento a carcaça foi submetida a refrigeração, reduziu cerca de 1 log UFC/cm² na contagem total dos micro-organismos mesófilos e 0,5 log UFC/cm² para enterobactérias e *E. coli*, enquanto que o tratamento controle (T0) que utilizou somente água a temperatura ambiente, também seguido da refrigeração da carcaça, não obteve a mesma redução. Somente a refrigeração (dados verificados no T0) demonstrou reduzir 0,67 log para os micro-organismos aeróbios mesófilos e 0,33 e 0,05 log UFC/cm² para *E. coli* e enterobactérias, respectivamente. Similar ao obtido pelo tratamento 3 (T3) que utilizou banho com água a temperatura ambiente seguido da aspersão de ácido láctico a 1,5%, e a carcaça seguindo para refrigeração. Os dados apresentados nesse trabalho se assemelham com a redução em torno de 1 log obtida com a aplicação de água quente com temperatura >82°C por Gill e Bryant (1997). A pouca redução microbiana encontrada no T0, corrobora com o descrito sobre o assunto pela ICMSF, 2005, que somente banhar as carcaças e depois submetê-las a refrigeração representa pouco efeito sobre a redução microbiana. Para a água quente ser eficaz na redução

microbiana, ela deve ser mantida a temperatura $>74^{\circ}\text{C}$ na superfície da carcaça durante um tempo maior que 5 segundos (KOOHMARAIE et al., 2005).

Com relação ao tratamento 3 (T3) que utilizou banho com água a temperatura ambiente seguido da aspersão de ácido láctico a 1,5%, obtivemos pouca redução microbiológica ($0,54\log\text{ UFC/cm}^2$ de mesófilos e $0,31\log\text{ UFC/cm}^2$ de *E. coli*). A pouca redução alcançada pelo ácido láctico em relação a água quente, foi demonstrada no estudo realizado por Bosilevac et al. (2006), que utilizou ácido láctico a 2%, não sendo tão eficaz na redução de micro-organismos ($1,6\log\text{ UFC/cm}^2$) quanto a água quente a 76°C por 5,5 segundos que reduziu $2,7\log\text{ UFC/cm}^2$ de micro-organismos mesófilos e enterobacterias em carcaças bovinas. Segundo estudos realizados pelo International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2005), aplicar 1% de ácido láctico na superfície de carcaças bovinas e suínas reduz a contagem de micro-organismos mesófilos em $0,8\log_{10}$ a $1,9\log_{10}$, dados mais próximos ao encontrado em nosso estudo.

O ácido láctico é amplamente utilizado em abatedouros nos Estados Unidos da América. Em alguns, é utilizado como parte dos programas de BPF pelo seu efeito letal e injuriante sobre as células bacterianas. Alguns requisitos foram listados para que seu efeito seja eficaz como método de descontaminação: concentração do ácido entre 2,5 a 10% (v/v) para permitir o efeito quando diluído e aplicado nas carcaças; pH do ácido 2.8; temperatura do ácido $25-55^{\circ}\text{C}$; pressão de aplicação $13.8 - 27.6\text{ Kgf/cm}^2$; volume do ácido aplicado 500 ml; e 35 segundos de aplicação. (BOLTON; DOHERTY; SHERIDAN, 2001). Em nosso estudo, tendo em vista que não houve modificação nos equipamentos utilizados na rotina do abate, atendemos a quase todos os requisitos com exceção da concentração utilizada que foi menor (1,5%) e da pressão utilizada que foi de 2 Kgf/cm^2 , o que pode explicar a baixa redução microbiana alcançada quando foi aspergido nas carcaças.

Não houve alteração visual na coloração da pele das carcaças suínas tratadas com água quente e com ácido láctico a 1,5%, concordando com o estudo realizado por Pipek et al. (2005), de que não há variação na aparência da superfície das carcaças suínas tratadas com 2% de ácido láctico e vapor de água (pasteurização a $82^{\circ}-97^{\circ}\text{C}$).

Em um estudo realizado por Epling, Carpenter e Blankenship (1993), foi observada a redução de *Salmonella* spp. e de *Campylobacter* spp. em carcaças suínas após a aspersão de 2% de ácido láctico, o que não pode ser observado nesse trabalho, pois a prevalência foi baixa nas carcaças analisadas e não houve distribuição homogênea da frequência

de *Salmonella* spp. nas carcaças submetidas aos diferentes tratamentos para poder ser avaliada a redução.

Pode ser observado nesse estudo que a *Salmonella* spp. esteve presente nas carcaças suínas antes e após os tratamentos, demonstrando a permanência do patógeno proporcionando contaminação cruzada por equipamentos ou manipuladores durante o abate, ou pelo contato direto entre as carcaças durante o processo de refrigeração. A mesma conclusão foi obtida em estudo realizado por Swanenburg et al. (2001), no abate de rebanhos suínos sabidamente soropositivos e soronegativos, onde ocorreu contaminação cruzada entre as carcaças durante os procedimentos de abate e refrigeração.

O Brasil não possui um programa oficial de identificação e controle de *Salmonella* spp. em rebanhos suínos, desta forma não se sabe se os rebanhos que estão entrando para abate são ou não soropositivos para *Salmonella* spp.

Em nosso estudo, a prevalência de *Salmonella* spp. foi de 6,58% (5/76) semelhante ao encontrado na Dinamarca, onde 30 diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* foram isolados de 832 suínos (6,2%) no abate de 13468 suínos de terminação, sendo *Salmonella* Typhimurium o sorotipo predominante em 536 (64,4%) dos isolados (BAGGESEN et al., 1996).

Os sorotipos Typhimurium (2/5), Agona (2/5) e Derby (1/5) encontrados nesse estudo que foi realizado em Santa Catarina, Brasil, se assemelham ao estudo realizado em carcaças suínas por Seixas, Tochetto e Ferraz (2009) e são semelhantes aos sorotipos presentes no rebanho suíno de Santa Catarina, Brasil, demonstrado no trabalho realizado por Kich et al. (2011), onde o sorotipo Typhimurium foi o mais encontrado. Da mesma forma Bessa, Costa e Cardoso (2004) relataram a prevalência dos sorotipos Typhimurium, Agona e Derby em suínos abatidos no sul do Brasil.

Ao comparar-se os estudos de diversos autores em relação ao tempo de exposição e pressão utilizada no banho final da carcaça suína com o tempo e pressão do chuveiro utilizado no processo de abate no Brasil, que não utiliza métodos de descontaminação, verificamos a necessidade de se aumentar o tempo de exposição das carcaças suínas no banho final do abate e aumentar a pressão de saída da água dos bicos aspersores para melhoria do processo de redução microbiana.

3.4 CONCLUSÕES

Apesar de estatisticamente não ter havido diferença significativa na redução da contaminação por micro-organismos com os tratamentos utilizados nesse estudo, a redução pode ser observada.

O tratamento que demonstrou 100% de eficácia em reduzir o número de carcaças contaminadas com enterobactérias e *E. coli*, foi o tratamento 2 que consistiu na aplicação de água com temperatura entre 76°C e 78°C seguido de aspersão com ácido lático na concentração de 1,5%.

Utilizar água com temperatura acima de 76°C para o banho final das carcaças suínas, antes da entrada das carcaças nas câmaras frigoríficas demonstrou ser mais eficiente para redução microbiana que água a temperatura ambiente como é utilizada no processo de abate no Brasil.

Considerando a prevalência de 6,58% de *Salmonella* spp. encontrada nesse estudo, e sendo um patógeno de importância em saúde pública, é necessário se pensar na adoção de práticas de descontaminação com o objetivo de minimizar a disseminação do patógeno através de carcaças suínas até o consumidor. Isso inclui, a adoção de um programa de identificação de lotes positivos para *Salmonella* spp. antes da entrada dos animais no abatedouro.

Dessa forma, pode-se separar lotes positivos de lotes negativos, e estabelecer uma ordem de abate destes animais, para que se minimize ou se impeça a contaminação.

4 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS EM CARÇAÇAS SUÍNAS

A presença de micro-organismos na carne suína é o resultado da contaminação dos animais vivos, dos equipamentos, dos manipuladores e do ambiente de processamento (NESBAKKEN; SKJERVE, 1996). Isso demonstra a importância em se manejar os riscos associados à segurança da carne, desenvolvendo estratégias de controle dos patógenos em todas as etapas do processamento (SOFOS; GEORNARAS, 2010) e a necessidade em se utilizar metodologias para a detecção de micro-organismos de forma rápida e eficiente na rotina diagnóstica com intuito de prover informação adequada da possível presença de patógenos na matéria prima e nos produtos acabados no controle do processo de produção e para o monitoramento de práticas de higiene e limpeza industrial (BOER; BEUMER, 1999).

Os métodos de detecção microbiológica são frequentemente categorizados em dois grupos: convencionais ou tradicionais e rápidos ou alternativos. Os métodos tradicionais caracterizam-se por ser laboriosos, empregarem grandes volumes de meios de cultivo e requererem um tempo considerável para a obtenção de análises e resultados (JASSON et al., 2010). Os métodos rápidos são alternativos aos convencionais e são projetados para obter o resultado final em menor tempo. Isso é altamente desejável na indústria de alimentos, apesar das técnicas serem mais caras e requererem pessoal com alto nível de treinamento (FORSYTHE, 2002).

Considerando-se que o Brasil é um grande exportador de carne suína e a necessidade rápida de se conhecer a qualidade microbiológica desse produto, aliado a carência de pesquisas nessa matriz, este estudo teve como objetivo verificar o tempo necessário para a execução das análises e a correlação entre a metodologia convencional e as metodologias alternativas do sistema PetrifilmTM (3M) e sistema Tempo® (bioMerieux) para o diagnóstico de *Escherichia coli*, enterobactérias e micro-organismos mesófilos na matriz de carne suína.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de março de 2010 a março de 2011, foram analisadas 152 carcaças suínas coletadas no final da linha de um abatedouro sob Inspeção Federal e com abate diário de 4.500 suínos. Cada amostra foi constituída de *swabs* de esponja colhidos em quatro pontos da carcaça (pernil, barriga, lombo e papada) e acondicionados em

um único saco de *stomacher* estéril. Os quatro *swabs* de esponja juntos (100 cm² cada) representam a amostragem de uma área correspondente a 400 cm². As amostras das superfícies das carcaças foram coletadas pressionando-se a esponja, previamente umedecida em 100 mL de solução salina peptonada 0,1% estéril, sobre moldes delimitadores esterilizados, na área a ser amostrada (100 cm²) por cerca de 20 segundos, iniciando o procedimento no sentido vertical, depois esfregando horizontalmente e, por fim, no sentido diagonal. A esponja foi acondicionada em um saco de *stomacher* estéril e mantida sob refrigeração à 4 °C até o momento da análise no laboratório, que não ultrapassou 24 horas da coleta. Para o preparo da amostra utilizada para todas as metodologias, inicialmente procede-se uma fricção do saco de *stomacher* contendo a esponja em água peptonada 0,1% , e a partir desse homogeneizado preparou-se diluições de 1:10 e 1:100 (BRASIL, 2007).

Na metodologia convencional a amostra homogeneizada e diluída em 1:10 e 1:100 foi inoculada em ágar (Oxóid) específico para cada tipo de micro-organismo pesquisado, seguindo o preconizado para a metodologia convencional para os micro-organismos mesófilos, enterobactérias e *E. coli* (KORNACKI; JOHNSON, 2001; MORTON, 2001).

A metodologia alternativa PetrifilmTM é um sistema de plaqueamento chamado *all-in-one* na qual a placa de PetrifilmTM faz uso de um fino filme plástico que carrega o meio de cultura (JASSON et al., 2010). Os ingredientes deste meio de cultura variam para cada tipo de micro-organismo a ser identificado. Para a contagem de micro-organismos mesófilos neste sistema, inoculou-se 1 mL do homogeneizado e das diluições 1:10 e 1:100 em cartões PetrifilmTM AC e incubou-se a 36 °C ± 1 °C por 48 horas. Para contagem de enterobactérias, inoculou-se 1 mL do homogeneizado e das diluições 1:10 e 1:100 em cartões PetrifilmTM EB e incubou-se a 36 °C ± 1 °C por 24 horas. E para a contagem de *Escherichia coli*, inoculou-se 1 mL do homogeneizado e das diluições 1:10 e 1:100 sobre em cartões PetrifilmTM EC e incubou-se a 36 °C ± 1 °C por 24 horas. Após a incubação, procedeu-se a contagem das colônias e o resultado foi registrado em UFC/cm² (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Na metodologia utilizada para o sistema Tempo® para contagem total de micro-organismos mesófilos (TVC), reconstituiu-se o meio TVC com 3,0 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, adicionou-se 1 mL da amostra homogeneizada preparada sem diluição, completando 4 mL de volume total. Para a contagem de enterobactérias (EB), reconstituiu-se o meio EB com 3,9 mL de água destilada

esterilizada, adicionando 0,1 mL da amostra homogeneizada preparada sem diluição. Para a contagem de *Escherichia coli* (EC) reconstituiu-se o meio EC com 3,9 mL de água destilada esterilizada e em seguida, adicionou-se 0,1 mL da amostra homogeneizada. Os frascos e os cartões foram colocados no interior do equipamento, onde ocorreu a transferência do conteúdo do frasco para o cartão que contém 48 poços com três diferentes volumes (16 x 225 μ L; 16 x 22,5 μ L; 16 x 2,25 μ L). Imediatamente após o enchimento os cartões foram selados. Essa operação ocorre no interior da estação de trabalho denominada Tempo® preparo. Os cartões foram incubados em estufa por 24 horas, a 35°C para EB e EC e por 48 horas a 35° C para TVC. Após este período, realizou-se a leitura dos cartões na estação Tempo® leitora. Uma vez que a leitura foi concluída, os resultados foram analisados automaticamente pelo sistema, que determina quais os poços que foram positivos gerando os resultados em UFC/cm².

Foi utilizada a análise de regressão linear na análise estatística dos dados, determinando-se o coeficiente de correlação linear de Pearson (r) que varia de -1 a 1, para quantificar a correlação entre as metodologias utilizadas. Nesse intervalo os valores foram distribuídos, sendo considerado 0 para inexistência de correlação, 0,30 a 0,70 moderada correlação e de 0,70 a 1 forte correlação, não sendo encontrados nenhum resultado de correlação negativa (-1). Os dados referentes aos micro-organismos pesquisados foram analisados estatisticamente pelo programa STATÍSTICA 7.0, sendo realizada Análise de variância e teste de Tukey, a nível de 95% de confiança, (ANDRADE; OGLIARI, 2007).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo pode-se observar a redução do tempo de execução entre as metodologias utilizadas. Para as enterobactérias a redução do tempo desde o preparo da amostra até o resultado final emitido pelo sistema PetrifilmTM e pelo sistema Tempo® foi de 24 horas em relação a metodologia convencional. Para a contagem de *E. coli* houve uma redução de 144 horas dos dois sistemas alternativos em relação a metodologia convencional.

Através dos resultados da contagem de micro-organismos mesófilos, enterobactérias e *E. coli*, é possível observar que houve concordância entre as diferentes metodologias utilizadas, ao se examinar o coeficiente de correlação (r) em que consta uma associação linear positiva entre as metodologias, conforme apresentado na tabela 3,

concordando com estudos apresentados por Crowley et al. (2009), Sohier et al. (2007) e Owen, Willis e Lamph (2010).

Tabela 3 - Coeficiente de correlação (r) entre as diferentes metodologias (Convencional, Petrifilm™ e Tempo®) na contagem de micro-organismos mesófilos, enterobactérias e *E. coli* da superfície de carcaças suínas no período de março de 2010 a março de 2011

Metodologias	Mesófilos	Enterobactérias	<i>Escherichia coli</i>
Convencional x Tempo®	r= 0,6712	r=0,7535	r=0,6255
Convencional x Petrifilm™	r=0,7770	r=0,8368	r=0,3955
Petrifilm™ x Tempo®	r=0,8118	r=0,7480	r=0,5379

Fonte: Dados do autor

Nota: r = coeficiente de correlação de Pearson.

Com relação aos micro-organismos mesófilos, pode ser verificado que estes foram detectados em todas as metodologias utilizadas. Os resultados médios de contagem foram semelhantes entre as metodologias, sem diferença estatística entre as médias, sendo encontrado 3,44 log₁₀ de micro-organismos mesófilos para o método convencional, 3,47 log₁₀ de micro-organismos mesófilos para o Petrifilm™ e de 3,34 log₁₀ de micro-organismos mesófilos para o Tempo®, com um desvio padrão de 0,66 ; 0,63 e 0,66 respectivamente.

Escherichia coli foi detectada em todos os métodos utilizados. A presença da *E. coli* no Tempo® foi de 32,89% (50/152) , no Petrifilm™ foi de 38,82 % (59/152) e no método convencional foi de 31,58% (48/152). As enterobactérias foram detectadas em todos os métodos, sendo de 44,08% (67/152) no Tempo®, de 61,84% (94/152) no Petrifilm™ , e de 19,08% (29/152) no método convencional. Não houve diferença significativa entre as médias dos micro-organismos mesófilos, de *E. coli* e de enterobactérias, nos métodos testados.

Cattapan et al. (2007), Johnson (2007), Kunicka (2007) e Sohier et al. (2007) verificaram a redução de tempo em estudos de fluxo de trabalho que demonstraram uma redução de duas a três vezes no tempo de manipulação da amostra com a utilização do Tempo® em comparação com o método de referência ISO. Estes autores relatam a redução e a otimização do tempo de ensaio das amostras que se deve ao tipo de sistema utilizado pelo equipamento Tempo® totalmente automatizado e baseado no metabolismo de substratos específicos

produzidos pelos micro-organismos. Esse sistema miniaturizado utiliza o conceito da placa micro-tituladora que permite reduzir o volume reativo e o meio a ser empregado nos ensaios. A otimização do tempo e a especificidade do ensaio, utilizando-se a metodologia do sistema Tempo® também pode ser verificada nos resultados deste estudo.

A redução do tempo de ensaio e resposta pelo sistema Petrifilm™ se deve a simplicidade de manipulação e rapidez na contagem. O processo de identificação dos micro-organismos é realizado utilizando sais de tetrazólio como indicadores. Esse processo é considerado um método alternativo indireto para medir atividade respiratória do micro-organismo. A redução desse sal pela enzima mitocondrial succinato – desidrogenase leva a formação de um precipitado insolúvel de cor intensa. Os sais de tetrazólio, o cloreto de trifetil tetrazolium (TTC) e cloreto de iodo-nitrofenil tetrazólio (INT) utilizados são rapidamente reduzidos pela maioria dos sistemas desidrogenases dos micro-organismos. A transformação realiza-se somente em células vivas e a quantidade do composto produzido é proporcional ao número de células presentes. Silva, Cavalli e Oliveira (2006) recomendam o uso de Petrifilm™ EC como metodologia sensível e eficiente para contagem de *E. coli* em alimentos de origem animal em substituição a metodologia convencional. A simplicidade e rapidez dessa metodologia puderam ser verificadas nos ensaios deste estudo realizados com a metodologia do sistema Petrifilm™.

Houve moderada correlação entre a metodologia convencional e o Tempo® ($r=0,62$) para a *Escherichia coli*. Os resultados ainda demonstram uma moderada correlação entre a metodologia convencional e o Petrifilm™ ($r= 0,39$) e entre as duas metodologias alternativas Tempo® e Petrifilm™ ($r= 0,53$). A concordância entre a metodologia convencional e o Tempo® para detecção de *Escherichia coli* neste estudo foi menor que a concordância encontrada nos ensaios realizados por Green et al. (2007), sendo $r=0,92$ entre o método Tempo® e a metodologia convencional em placa para avaliação de *Escherichia coli* em amostras de produtos cárneos bovinos e de aves. A correlação também foi menor que a encontrada nos estudos comparativos realizados por Devulder et al. (2007), $r= 0,99$ em produtos a base de carne. Podemos atribuir as diferenças de correlação dos diferentes estudos na detecção da *Escherichia coli*, à qualidade microbiológica das amostras.

Estudos realizados por Sohier et al. (2007) demonstram níveis similares ou mais altos de repetibilidade e reprodutibilidade pelo Tempo® comparados com o método padrão de contagem em placas.

Crowley et al. (2010) mostra em seu trabalho que para a detecção de *E. coli* o Tempo® EC possui no meio de cultura o substrato fluorogênico, 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronideo (MUG), que é clivado pela enzima β- glucuronidase, produzida pela maioria das cepas da *E. coli*. Ao ser clivado, o MUG produz fluorescência sendo então detectada pelo Tempo® Reader. Dentre os métodos utilizados neste estudo, a melhor concordância para detecção de *E. coli* ($r= 0,62$) foi verificada entre a metodologia convencional e o Tempo® , o que demonstra a sensibilidade e especificidade de detecção do método, confirmada pelos resultados encontrados neste estudo.

Para as enterobactérias houve forte correlação entre a metodologia convencional e o Tempo® ($r= 0,75$), entre a metodologia convencional e o Petrifilm™ ($r= 0,83$), e entre as duas metodologias alternativas Tempo® e Petrifilm™ ($r= 0,75$). Em estudo realizado por Owen, Willis e Lamph (2010) foram encontrados coeficientes de correlação equivalentes ($r= 0,75$ a $0,78$) aos encontrados neste estudo, quando avaliou o Tempo® EB em relação a técnica do número mais provável e semeadura em superfície e profundidade. A detecção de enterobactérias pelo Tempo® foi demonstrada em estudo realizado por Sohier et al. (2007), com níveis similares ou mais altos de repetibilidade e reprodutibilidade desse método quando comparado com o método padrão de contagem em placas.

A especificidade do Tempo® EB para detecção de enterobactérias pode ser entendida pela reação que ocorre entre o micro-organismo e o meio de cultura presente nos frascos que contém uma molécula fluorescente, o 4-metil umbelliferone (4MU), indicadora de pH (JOHNSON; MILLS; BEZZOLE, 2008). Quando o pH está neutro há emissão de fluorescência. Os micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* presentes no cartão assimilam os nutrientes do meio de cultura durante a incubação, resultando em um incremento do pH. Quando ocorre a fermentação da glicose por esses micro-organismos há acidificação do reagente, que resulta em extinção da fluorescência em tubos com reação positiva, conforme já relatado em estudos realizados por Owen, Willis e Lamph (2010), Johnson, Mills e Bezzole (2009) e Colón-Reveles et al. (2007).

Silbernagel e Lindberg (2003). Estes pesquisadores obtiveram precisão nos resultados em estudo de repetitividade em diversas amostras de alimentos com o uso do Petrifilm™ e a metodologia convencional, e recomendam o seu uso na contagem de enterobactérias para diversos alimentos, entre eles carne preparada congelada. Nesta pesquisa, foram obtidos resultados positivos com $r= 0,83$ de

concordância entre o Petrifilm™ EB e a metodologia convencional para enterobactérias em *swab* de carcaça suína concordando com o estudo feito por Silbernagel e Lindberg (2002), no qual o Petrifilm™ EB foi mais sensível e seletivo se comparado à sensibilidade do método convencional em placa com ágar Violeta Vermelho Bile Glicose (VRBG). Ambos os métodos alternativos utilizados neste estudo, foram sensíveis e específicos na detecção das enterobactérias.

A correlação foi mediana entre a metodologia convencional e o Tempo® (R= 0,67) para os micro-organismos mesófilos. Estes resultados representam menor correlação em relação ao estudo de avaliação realizado por Green et al. (2007), quando foi encontrado $r=0,97$ entre o método Tempo® e o método convencional em placa para a contagem de micro-organismos mesófilos. O mesmo foi observado em relação ao estudo realizado por Devulder et al. (2007) e Crowley et al. (2009) que encontraram $r=0,95$ de concordância para as mesmas metodologias. Foi observada neste estudo, uma forte correlação entre a metodologia convencional e o Petrifilm™ (R= 0,77) e entre as duas metodologias alternativas Tempo® e Petrifilm™ (R= 0,81).

4.3 CONCLUSÕES

Embora algumas pesquisas com os métodos alternativos estudados já tenham sido publicadas, os resultados desse estudo contribuíram para a avaliação dessas metodologias em matriz de carnes suínas até então não estudadas.

Neste estudo as amostras foram provenientes de swabs de carcaças suínas processadas em um abatedouro sob Inspeção Federal com todos os programas de Boas Práticas de Fabricação e qualidade implantados, o que conferiu qualidade microbiológica às amostras e baixo número de *Escherichia coli* detectadas nas metodologias avaliadas.

A metodologia do sistema TEMPO® demonstrou vantagem em relação às demais metodologias avaliadas neste estudo, por processar um número maior de amostras por intervalo de tempo, reduzir o volume de material e espaço necessário para realização dos ensaios e pela automatização que confere rapidez ao processo, porém a metodologia do sistema Petrifilm™ mostrou resposta ligeiramente melhor em relação a contagem de micro-organismos mesófilos e enterobactérias.

Ambos os métodos podem ser recomendados para a matriz de carne suína, beneficiando assim a indústria processadora que necessita de respostas rápidas no seu processo produtivo.

5 INVESTIGAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EM CARÇAÇAS SUÍNAS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL

Desde que foi identificada em 1982 nos EUA, a *Escherichia coli* O157:H7 se tornou um patógeno importante e objeto de muitas pesquisas. Causadora de diversos surtos de infecção alimentar associada à diarreia com sangue (DOYLE et al., 2007), é o sorotipo de maior predominância no grupo da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Seus sintomas vão desde uma diarreia branda passando por Colite Hemorrágica (HC), Síndrome Hemolítica Urêmica (HUS) a púrpura trombótica trombocitopênica (TTP) em humanos (CONEDERA et al., 2007; O'LOUGHLIN; ROBINS-BROWNE, 2001). Todas as EHEC produzem fatores de citotoxicidade chamados de verotoxina (VT) ou shiga-like toxinas (SLTs), que são proteínas tóxicas, biologicamente, estruturalmente e antigenicamente similares a shiga-toxina (ShT) produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1 (AGBODAZE, 1999; LAW, 2000; MENG et al., 2007; MENG; ZHAO; DOYLE, 1998), associadas aos surtos em humanos (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010).

Estudos demonstram que o trato intestinal de bovinos é o principal reservatório da *E. coli* O157:H7, entretanto esta bactéria tem sido isolada em outros ruminantes como ovinos, caprinos e, esporadicamente, em frangos e suínos (AL-GALLAS et al., 2002; ATEBA; BEZUIDENHOUT, 2008; SILVA, A. et al., 2001). Como agente de doenças veiculadas por alimentos tem sido, especialmente, associada ao consumo de carne bovina mal cozida, de leite não pasteurizado e águas de abastecimento e de recreação contaminadas pelo conteúdo intestinal de animais (ACHESON et al., 1996; ATEBA; MBEWE, 2011; HUSSEIN; BOLLINGER, 2005; SANDRINI et al., 2007).

A *Escherichia coli* O157:H7 possui muitas características típicas de *E. coli*, porém apresenta algumas especificidades como a ausência ou baixa fermentação do sorbitol e ausência da atividade da enzima β -D-glucoronidase (MENG et al., 2007).

Métodos rápidos de detecção de *Escherichia coli* O157 de alimentos estão comercialmente disponíveis, muitos deles são baseados em tecnologias imunoenzimáticas e hibridização de ácidos nucleicos. Os limites de detecção (tipicamente 10^5 UFC/mL para ELISA) são alcançados após uma etapa de pré-enriquecimento que permite a recuperação dos micro-organismos alvos. A detecção qualitativa de *Escherichia coli* O157 pode ser realizada pelo teste automatizado do

sistema Vidas® e nos produtos de alimentação humana pela técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) (BLACKBURN; MCCARTHY, 2000).

Tendo em vista que *Escherichia coli* O157:H7 foi naturalmente encontrada em diversos alimentos como vegetais frescos (HUANG et al., 2005), carne e produtos lácteos (Al-GALLAS et al., 2002; HUSSEIN; BOLLINGER, 2005), leite e água de consumo (CLOUGH; CLANCY; FRENCH, 2006; SANDRINI et al., 2007), carcaças bovinas (FEGAN et al., 2005), carne suína e produtos cárneos suínos (ATEBA; MBEWE, 2011; OTEIZA et al., 2006), o objetivo deste estudo foi investigar *Escherichia coli* O157:H7 em carcaças suínas produzidas no Estado de Santa Catarina, Brasil.

5.1 AMOSTRAS

Durante o período de março de 2010 a março de 2011, foram analisadas 152 amostras coletadas de 76 carcaças suínas coletadas no final da linha de um abatedouro sob Inspeção Federal e com abate diário de 4.500 suínos. Cada amostra foi constituída de *swabs* de esponja coletados em quatro pontos da carcaça (pernil, barriga, lombo e papada) e acondicionados em um único saco de *stomacher* estéril. Os quatro *swabs* de esponja juntos (100 cm² cada) representam a amostragem de uma área correspondente a 400 cm². As amostras das superfícies das carcaças foram coletadas pressionando-se a esponja, previamente umedecida em 100 mL de solução salina peptonada 0,1% estéril, sobre moldes delimitadores esterilizados, na área a ser amostrada (100 cm²) por cerca de 20 segundos, iniciando o procedimento no sentido vertical, depois esfregando horizontalmente e, por fim, no sentido diagonal. A esponja foi acondicionada em um saco de *stomacher* estéril e mantida sob refrigeração à 4 °C até o momento da análise no laboratório, que não ultrapassou 24 horas da coleta.

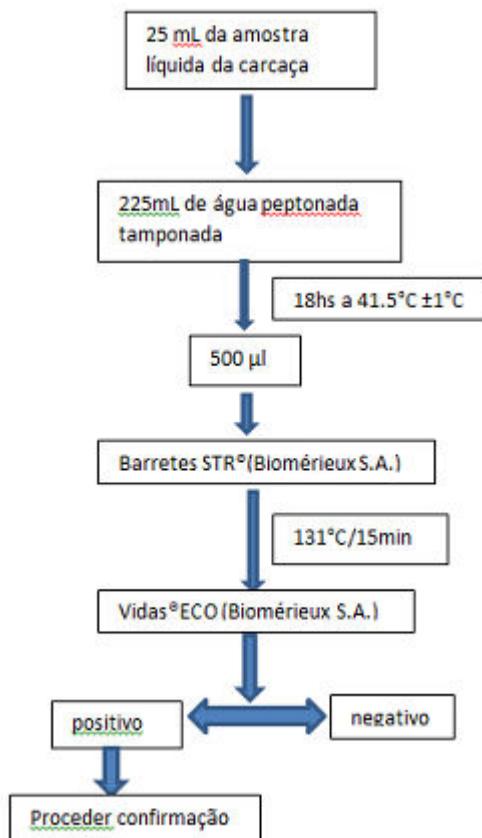
5.2 DETECÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7

Para a identificação de *Escherichia coli* O157:H7 foi utilizada a metodologia do sistema Vidas® (Biomérieux S.A.) e a metodologia convencional como etapa posterior para confirmação (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2001). O fluxograma da metodologia utilizada no sistema Vidas® (Biomérieux S.A.) para detecção de *Escherichia coli* O157:H7 nas carcaças suínas está demonstrado na Figura 12. Seguindo o protocolo recomendado pelo

fabricante, as amostras positivas foram encaminhadas para confirmação pela metodologia convencional, técnica de aglutinação em lâmina com soro anti *Escherichia coli* O157 (Probac do Brasil, SP) e análise de PCR realizada pelo Departamento de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz, situado na cidade do Rio de Janeiro - Brasil.

A metodologia convencional utilizada foi descrita pelo *American Public Health Association* - APHA (2001), e após selecionando-se cinco a dez colônias típicas para confirmação bioquímica e genotípica por PCR.

Figura 12 - Fluxograma das etapas utilizadas na metodologia do sistema Vidas® (Biomérieux S.A.) para detecção de *Escherichia coli* O157:H7 em carcaças suínas



5.3 RESULTADOS

Para as amostras de carcaças suínas foram observados três resultados positivos pelo sistema Vidas®. Estas amostras positivas foram plaqueadas em TC-SMAC e foram observadas colônias típicas translúcidas com centro acinzentado (1-2 mm) e com soroaaglutinação das colônias, porém não houve confirmação por PCR e não foram encontrados os genes de virulência (*rfbO157*, *stx1*, *stx2*). A identificação genotípica revelou *Salmonella* sorotipo Agona.

5.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No Brasil existem poucos estudos para caracterização de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos de origem animal e em seus resultados foram detectadas baixa incidência ou ausência do patógeno (JAKABI et al., 2004; PRATA, 2009; SANDRINI et al., 2007; SILVA, A. et al., 2001; SILVEIRA, 2010). Cepas de *Escherichia coli* produtoras de Shiga toxina foram constatadas com maior incidência nas fezes e soro do rebanho bovino brasileiro (CERQUEIRA et al., 1999; IRINO et al., 2005; LEOMIL et al., 2003).

Os resultados desta pesquisa com amostras de carcaças suínas produzidas no Estado de Santa Catarina revelam uma baixa frequência de *Escherichia coli* O157:H7 nesses produtos e estão em consonância com os demais estudos desenvolvidos no Brasil, nas quais a incidência da *Escherichia coli* foi baixa ou nula (JAKABI et al., 2004; PRATA, 2009; SANDRINI et al., 2007; SILVA, A. et al., 2001; SILVEIRA, 2010).

A ausência de resultados positivos para *Escherichia coli* O157:H7 em produtos de origem animal no Brasil diverge dos resultados encontrados nos alimentos de diversos países.

Na Nova Zelândia, Wong, MacDiarmid e Cook (2009) encontraram uma prevalência de 1% em 100 amostras de carcaças suínas. Na África do Sul, Ateba e Mbewe (2011) confirmaram 130 isolados de *Escherichia coli* O157:H7 em 220 amostras, a prevalência foi maior em carne e produtos suínos (67,7%). Na Espanha, Mora et al. (2005) examinaram 722 amostras de STEC isoladas, todas recuperadas de humanos, gado bovino, ovino e alimentos durante os anos de 1992-1999, sendo que 141 destas foram identificadas como *Escherichia coli* O157:H7. Na Irlanda, Carney et al. (2006) analisaram 1351 recortes de carne bovina, 131 carcaças e 132 carne de cabeças bovinas e destas a *Escherichia coli* O157:H7 foi recuperada de 2,4% (32/1351) de recortes

de carne bovina, 3,0% (4/132) de carcaças e 3,0% (3/100) de carne de cabeça.

Vernozy-Rozand et al. (2002) desenvolveu estudo com 3450 amostras de carne bovina picada, 175 deram positivas na detecção pelo método Vidas *E.coli* O157 (ELFA). Destas, 4 colônias foram confirmadas pelo Vidas ICE e identificadas como sorbitol negativa e produtoras de vero toxinas, confirmadas como O157-positivas, H7-positiva. No México, Varela-Hernández et al. (2007) analisaram 258 amostras de carcaças bovinas e 2,7% (7/258) foi identificada como *Escherichia coli* O157:H7.

Na Austrália, Fegan et al. (2005) analisou 606 amostras. Deste total 100 eram swabs de carcaças com 6 % de resultados positivos para *Escherichia coli* O157:H7. Na Tunísia, Al-Gallas et al. (2002) pesquisou 204 amostras de produtos cárneos e lácteos e isolou 3 *Escherichia coli* do grupo STEC. Na Nigéria, Ojo et al. (2010) encontrou 7,3% (154/2133) de cepas de *Escherichia coli* pertencentes ao grupo STEC, destas, 4% foi detectada em carne suína, 3,8% em carne bovina e 1,7% em carne de carneiro. A taxa de detecção de *Escherichia coli* O157:H7 foi de 5% nas 2.133 amostras.

Lee et al. (2009), na Coreia, analisou 3 mil amostras de carne bovina, suína e frango e encontraram 273 amostras positivas para *Escherichia coli*, sendo 35,9% classificadas como do grupo EHEC. Na Áustria, Halabi et al. (2008) pesquisou 2633 amostras de água, 280 foram positivas para *Escherichia coli*, e destas 3,9% (11/280) apresentaram os fatores de virulência presentes no grupo EHEC. Nos EUA, Hussein e Bollinger (2005) publicaram uma revisão de artigos sobre carne bovina contaminada. Nesta revisão foram avaliadas as taxas de prevalência e os riscos a saúde pública com a contaminação por *Escherichia coli* pertencente ao grupo STEC. Foram encontradas taxas de prevalência de O157 que variaram de 0,01 a 54,2%.

Na Turquia, Sarimehmetoglu et al. (2009) analisou 251 amostras de carne moída fresca bovina e 7,6% (19/251) foram positivas para *Escherichia coli* O157:H7. Çadirci et al. (2010) realizou um trabalho com 200 amostras de carne bovina fresca, sendo detectada *Escherichia coli* O157 em 2,5% (5/200) delas.

Na Itália, Conedera et al. (2007) analisou 3879 amostras de alimentos para presença de *Escherichia coli* O157 (VETC), sendo 931 carne bovina picada e 2948 produtos lácteos (leite pasteurizado, sem pasteurização e queijos). Foram isoladas *Escherichia coli* O157 em 0,43% (4/931) da carne bovina picada e uma cepa O157 em queijo. Esta cepa não possuía os genes *stx1* e *stx2* e sim o gene *eae*, indicando

patogenicidade. Na Argentina, Oteiza et al. (2006) analisou 100 salsichas prê cozidas (morcilla), em 2% das amostras se identificou a *Escherichia coli* O157:H7.

Na Grécia, Dontorou et al. (2003) realizou uma pesquisa com 600 amostras de leite não pasteurizado, carne picada crua, hambúrguer bovino, sanduíches, salada, salsicha grega tradicional e intestino suíno preparado com objetivo de constatar a presença da *Escherichia coli* O157:H7. O patógeno foi detectado em 1% (1/100) das amostras de leite e 1,3% (1/75) das salsichas frescas e 2% (1/50) dos intestinos suínos preparados. Chye, Abdullah e Ayob (2004) também realizaram um estudo com 930 amostras de leite cru coletado em tanques de 360 fazendas leiteiras da Malásia, a *Escherichia coli* O157:H7 foi detectada em 33,5% (312/930) das 930 amostras.

Huang et al. (2005) realizou um trabalho de pesquisa em vegetais cortados frescos, inoculados artificialmente com *Escherichia coli* O157 e analisados pela metodologia do sistema Vidas®, e os resultados mostraram que 40% das amostras controle foram positivas para *Escherichia coli* O157, no sistema Vidas®, enquanto que nenhum resultado positivo foi encontrado por PCR multiplex, concluindo, dessa forma, que os resultados falso-positivos encontrados no sistema Vidas® foram afetados por *Morganella morganii* e *Enterobacter cloacae* devido a similaridade antigênica.

Resultado semelhante foi encontrado neste estudo, nas amostras das carcaças suínas, nas quais três resultados foram positivos no sistema Vidas®, porém tratava-se de um resultado falso-positivo. Isso se dá porque alguns sorotipos de *Salmonella* podem interferir na metodologia da técnica ELFA gerando resultados falso-positivos, já que possuem capsula antigênica (antígeno O) semelhante à encontrada na *Escherichia coli* O157 (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2001; HUANG et al., 2005).

Os resultados negativos para a *Escherichia coli* O157:H7 encontrados nesta pesquisa são conclusivos para indicar a ausência do patógeno nas carcaças suínas amostradas no Estado de Santa Catarina. A comparação dos dados deste estudo com dados dos demais estudos realizados no Brasil não pode ser realizada em virtude da variabilidade de amostras e técnicas metodológicas utilizadas nos ensaios. No Brasil não foi possível, até o momento, estabelecer a incidência e prevalência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos de origem animal, diferentemente do que ocorre nos outros países.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A primeira parte desse estudo, consistiu na aplicação de métodos descontaminantes e foi desenvolvida em um estabelecimento considerado modelo no abate de suínos no Estado de Santa Catarina, Brasil. O design industrial desse abatedouro segue um fluxo em linha reta, o que permite evitar contra fluxo durante o processo de abate e com isso minimizarmos as contaminações cruzadas entre as carcaças. As verificações da aplicação das Boas práticas de Fabricação e dos programas de controle da higiene operacional demonstraram o bom nível sanitário do estabelecimento o qual foi confirmado nos resultados das análises com baixos índices de contaminação por micro-organismos mesófilos, enterobactérias e *E. coli* nas carcaças amostradas.

A ocorrência de *Salmonella* spp. nas carcaças amostradas demonstra a necessidade de conhecermos a prevalência desse patógeno no rebanho suíno, quando este entra para o abate, para que parâmetros do limite máximo do patógeno nas carcaças suínas possam ser fixados pela legislação do Ministério da Agricultura, e dessa forma qualificarmos e quantificarmos o patógeno e o seu real significado em termos de risco sanitário.

A ausência de resultados positivos de *E. coli* O157 nas carcaças suínas amostradas demonstrou que podemos estar diante de baixas incidências do patógeno no rebanho suíno, porém há necessidade de contínuo monitoramento para que, se detectado, o perigo possa ser controlado a tempo de não por em risco a saúde pública.

O foco ao se utilizar procedimentos de descontaminação é para a redução de micro-organismos patogênicos. Nesse estudo, devido à escassez de resultados positivos para os micro-organismos patogênicos, após a aplicação de todos os tratamentos descontaminantes utilizados, não houve subsídio suficiente para uma avaliação mais detalhada. A literatura científica cita a necessidade do uso de procedimentos descontaminantes naquelas carcaças que apresentam altos níveis de contaminação microbiana ao final do abate, o que não pôde ser verificado nesse estudo.

Há um ganho sanitário nas etapas posteriores ao abate, por redução da carga microbiana das carcaças.

Conclui-se que a prevalência de micro-organismos indicadores e patogênicos que podem estar presentes nas carcaças suínas durante o processo de abate, se mostra dependente não só da carga microbiana na entrada do abatedouro como também dos procedimentos adotados durante o abate.

Entende-se que em determinadas circunstâncias, quando se conhece a carga microbiana patogênica que entra no abatedouro, há necessidade de se introduzir métodos de descontaminação em carcaças suínas, com o objetivo de redução de patógenos.

A segunda parte desse estudo, consistiu da realização das análises microbiológicas com diferentes metodologias e foi realizada no laboratório de microbiologia de alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, o qual possui todos os requisitos necessários para a realização dos ensaios, sendo credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Os resultados das metodologias convencionais utilizadas foram comparados com os resultados das metodologias alternativas TEMPO® e PETRIFILM™, e obteve-se correlações positivas nos diferentes ensaios realizados.

O sistema TEMPO® processa 500 testes em 4 horas e os resultados para micro-organismos mesófilos, enterobactérias e *E. coli* é obtido entre 24 e 48 horas. O sistema PETRIFILM™ reduz etapas comparadas com o sistema convencional e os resultados também são obtidos entre 24 e 48 horas.

A utilização de metodologias alternativas deve ser estimulada e utilizada, pois há uma economia significativa de material, mão de obra e redução do tempo de realização dos ensaios até a obtenção dos resultados, significando um ganho para os laboratórios que realizam os ensaios, para a indústria que necessita de resultados rápidos e confiáveis, e para o população que recebe para consumo produtos de origem animal de forma segura.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. 3. ed. Washington, DC: Pan American Health Organization, 2003. v. 1.
- ACHESON, D. W. K. et al. Detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and milk by commercial enzyme immunoassay. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 59, n. 4, p. 344-349, 1996.
- AFNOR VALIDATION. **Validated methods**. Disponível em: <www.afnor-validation.com>. Acesso em: 20 maio 2011.
- AGBODAZE, D. Verocytotoxins (Shiga-like toxins) produced by *Escherichia coli*: a minireview of their classification, clinical presentations and management of a heterogeneous family of cytotoxins. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Amsterdã, Holanda, v. 22, n. 4, p. 221-230, 1999.
- AL-GALLAS, N. et al. A. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 19, p. 389-398, 2002.
- ALMEIDA, I. A. Z. C. et al. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990-1999. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, n. 59, p. 33-37, 2000.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC, 2001.
- ANDRADE, D. F.; OGLIARI, P. J. **Estatística para ciências agrárias e biológicas**. Florianópolis: UFSC, 2007.
- ANDREWS, W. H. et al. *Salmonella*. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC, 2001. p. 357-380.

ANIL, M. H.; WHITTINGTON, P. E.; MCKINSTRY J. L. The effect of the sticking method on the welfare of slaughter pigs. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 55, p. 315-319, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. **A carne suína brasileira**. São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2010_pt.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2012.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 17. ed. Washington, DC, 2002. v. 1.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS RESEARCH NEWS. TEMPO[®] EB Test Granted PTM Status. **Inside Laboratory Management**, Marcy l'Etoile, France, may/june 2009.

ATEBA, C. N.; BEZUIDENHOUT, C. C. Characterisation of *Escherichia coli* O157 strains from humans, cattle and pigs in the North-West Province, South Africa. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 128, p. 181-188, 2008.

ATEBA, C. N.; MBEWE, M. Detection of *Escherichia 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**, Amsterdã, Holanda, p. 1-9, 2011.

AYMERICH, T.; PICOUET, P. A.; MONFORT, J. M. Decontamination technologies for meat products. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 78, p. 114-129, 2008.

BAGGESEN, D. L. et al. Herd prevalence of *Salmonella* enterica infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. **Preventive veterinary medicine**, Amsterdã, Holanda, n. 26, p. 201-213, 1996.

BEARSON, B. L.; BEARSON, S. M. D. Host specific differences alter the requirement for certain *Salmonella* genes during swine colonization. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 150, n. 3-4, p. 215-219, jun. 2011.

BELK, K. E. Beef decontamination technologies. **Beef Facts**, Centennial, CO, v. 11, p. 1-4, 2002.

BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 36, p. 199-206, 1997.

BERGEY, D. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 7. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* spp em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 24, n. 2, p. 80-84, abr./jun. 2004.

BINTER, C. et al. Transmission and control of *Salmonella* in the pig feed chain: a conceptual model. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 145, p. 7-17, mar. 2011.

BIOMERIEUX. **Manual de treinamento**. Paris, France, 2008.

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

BLAHA, T. G. Pre-harvest food safety and *Salmonella* reduction in the pork chain. In: CONGRESSO ABRAVES, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2001.

BLOCH, N. et al. The enumeration of Coliforms and E. Coli on naturally contaminated beef: a comparison of the PetrifilmTM Method with the Australian Standard. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, v. 43, n. 2, p. 187-193, 1996.

BLOOD, R. M.; CURTIS, G. D. W. Media for total *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 26, p. 93-115, 1995.

BOER, E. D.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food**

Microbiology, Amsterdã, Holanda, v. 50, n. 1-2, p. 119-130, 1999.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160599000811>

>. Acesso em: 10 jun. 2011.

BOLTON, D. J.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J. Beef HACCP: intervention and non-intervention systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 66, p. 119-129, 2001.

BOLTON, D. J.; PEARCE, R.; SHERIDAN, J. Risk based determination of critical control points for pork slaughter. **Food Safety**, Ashtown, Dublin, 2002.

BOLTON, D. J. et al. Decontamination of pork carcasses during scalding and the prevention of *Salmonella* cross-contamination. **Journal of Applied Microbiology**, New Jersey, n. 94, p. 1036-1042, 2003.

BOSILEVAC, J. M. et al. Treatments using hot water instead of lactic acid reduce levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* and reduce the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on preevisceration beef carcasses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 69, n. 8, p. 1808-1813, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 jul. 1952. Seção I, p. 10785.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n. 368, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiénico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção I, p. 19697.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Circular nº 130 de 13 de fevereiro de 2007**. Brasília, DF, 2007. Exportação de carne suína para os Estados Membros da União Europeia. Disponível em: <http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif/principal_sigsif>. Acesso em: 11 jun. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Circular nº 640/2004/DCI/DIPOA de 22 de outubro de 2004.** Brasília, DF, 2004. Uso de descontaminante de carcaças em estabelecimentos habilitados à exportação.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 40, de 12 de dezembro de 2005. Aprova os Métodos Analíticos, Isolamento e Identificação da *Salmonella* na carne bovina, avicultura e produtos derivados de ovos - MLG - 4.03, Metodologia Alternativa de *Salmonella* A-Bax -MLG 4C .01, Isolamento e Identificação de *Listeria Monocytogenes* em carne vermelha, carne de ave, ovos e amostras ambientais, MLG 8.04 - Metodologia Alternativa de *Listeria* A-BAX MLG-8 A .01, *Escherichia coli*, MPN AOAC 966.24, Método Petrifilm AOAC 998.08, que passam a constituir Padrões Oficiais para Análise de Microbiologia de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 dez. 2005. Seção I, p. 70. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle: APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 fev. 1998. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 711, de 01 de novembro de 1995. Aprova as normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 nov. 1995. Seção I, p. 17625.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas pelos alimentos no brasil.** Brasília, DF, 2010. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758>. Acesso em: 18 ago. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 jan. 2012. Seção I, p. 43-49.

ÇADIRCI, Ö. et al. 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**, Amsterdã, Holanda, v. 84, p. 553-556, 2010.

CAREY, C. M. et al. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdã, Holanda, n. 73, p. 125-132, 2008.

CARNEY, E. O'BRIEN et al. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 23, p. 52-59, 2006.

CARPENTER, C. E.; SMITH, J. V.; BROADBENT, J. R. Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 88, p. 256-260, 2011.

CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; ROSSI, D. A. Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 3, n. 66, p. 278-286, 2007.

CATTANI, C. S. de O. **Fotos de arquivo pessoal**. Chapecó, 2010.

CATTANI, C. S. de O. **Fotos de arquivo pessoal**. Florianópolis, 2011.

CATTANI, C. S. de O. **Ocorrência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* isoladas em produtos cárneos suínos no estado de Santa Catarina, no período de 2007 a 2010**. Dissertação (Mestrado

Profissional em Higiene, Inspeção e Tecnologia de Alimentos de Origem Animal)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

CATTAPAN, F.; VILLARD, P.; DUMONT, N. **A new approach for workflow evaluation in food microbiology laboratories: TEMPO**, Automated MPN Method Versus Plate Count Method. Paris, France: bioMérieux, 2009. Disponível em: <<http://www.biomerieux-usa.com/upload/TEMPO%20workflow%20CHELAB-1.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2011.

CATTAPAN, F. et al. **New approach for workflow evaluation in food microbiology laboratories: TEMPO®**, Automated MPN Method Versus Plate Count Method. Paris, France: bioMérieux, 2007. Disponível em: <http://www.foodprotection.org/files/annual_meeting/poster-abstracts-2007.pdf>. Acesso em: 05 maio 2011.

CERQUEIRA, A. M. F. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 70, p. 111-121, 1999.

CHYE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 21, p. 535-541, 2004.

CLOUGH, H. E.; CLANCY, D.; FRENCH, N. P. Vero-Cytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in pasteurized milk containers at the point of retail: a qualitative approach to exposure assessment. **Risk Analysis**, New Jersey, v. 26, n.5, p. 1291-1309, 2006.

CODE of Hygienic Practice for Meat: CAC/RCP 58-2005. 2009. Disponível em: <www.codexalimentarius.net>. Acesso em: 11 julho 2011.

CODE of Hygienic Practice for Meat: proyecto de codigo de praticas de higiene para la carne. FAO, 2004a. ALINORM 04/27/16.

CODE of Hygienic Practice for Meat: regulation (EC) n° 853/2004 of the European Parliament and the Concil of 29 april 2004, laying down

specific hygiene rules for food of animal origin. **Official Journal of the European Union**, União Européia, 30 apr. 2004b.

COLÓN-REVELES, J. et al. **Evaluation of the TEMPO® EB Method for the Enumeration of Enterobacteriaceae in foods**. Durham: bioMérieux, 2007. p. 3-47. Disponível em: <<http://www.biomerieuxusa.com/upload/TEMPO%20EB%20bMx%20US-2.pdf>> . Acesso em: 02 maio 2011.

CONEDERA, G. et al. A Family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami. **Epidemiology Infect**, Cambridge, UK, v. 135, p. 311-314, 2007.

CONTROL de peligros que amenazan la salud de las personas y de los animales mediante la inspección ante mortem y post mortem de la carne. Paris, France, 2006. Documento informativo elaborado por el grupo de trabajo de la OIE sobre la Seguridad Sanitaria de los Alimentos Derivados de la Producción Animal.

CORNICK, N. A.; HELGERSON, A. F. Transmission and infectious dose of *Escherichia coli* O157:H7 in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 9, p. 5331-5335, sept. 2004.

CORTIÑAS A. J. et al. *Salmonella serosurveillance*: different statistical methods to categorise pig herds based on serological data. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdã, Holanda, n. 89, p. 59-66, 2009.

CROWLEY, E. S. et al. TEMPO®EC for the enumeration of *Escherichia coli* in foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, MD, v. 93, p. 576-586, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>> . Acesso em: 05 maio 2011.

CROWLEY, E. S. et al. TEMPO®TVC for the enumeration of aerobic mesophilic flora in foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, MD, v. 92, n. 1, p. 165-174, 2009. Disponível em: <http://www.foodhygiene.or.kr/admin/down_file.php.pdf> . Acesso em: 05 maio 2011.

D'AOUST, J.; MAURER, J.; BAILEY, J. S. *Salmonella* Species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. 3. ed. Washington, DC: Montville, 2007.

DALLACOSTA, O. A. et al. Avaliação das condições de transporte, desembarque e ocorrência de quedas dos suínos na perspectiva do bem-estar animal. **Comunicado técnico**, Concórdia, n. 459, dez. 2007.

DAVIDSON, P. M.; TAYLOR T. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 3. ed. Washington, D.C.: Montville, 2007.

DE BOER, E.; HEUVELINK, A. E. Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, New Jersey, v. 88, p. 133-143, 2000

DE BUSSER, E. V. et al. Detecção and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 145, n. 1, p. 275-286, 2011.

DEVULDER, G. et al. **Comparison of TEMPO® TVC, TEMPO® TC, TEMPO® EC with conventional culture methods in Meat Based Products**. Paris, France: bioMérieux, 2007. Disponível em: <<http://www.biomerieux-usa.com/upload/TEMPO.pdf>>. Acesso em: 02 maio 2011.

DONTOROU, C. et al. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 82, p. 273-279, 2003.

DORSA, W. J. et al. Microbial decontamination of beef and sheep carcasses by steam, hot water spray washes, and a steam-vacuum sanitizer. **Journal of food protection**, Des Moines, IA, v. 59, n. 2, p. 127-135, 1995.

DOYLE, M. et al. *E. coli* O157:H7 in food. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. 3. ed. Washington, D.C.: Montville, 2007. p. 171-192.

EPLING, L. K.; CARPENTER, J. A.; BLANKENSHIP, L. C. Prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. on pork carcasses and the reduction effected by spraying with lactic acid. **Journal of Food protection**, Des Moines, IA, v. 56, n. 6, p. 536-540, 1993.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. **Centers for disease control and prevention**. 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/>>. Acesso em: 3 maio 2011.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. **FSIS directive 7120.1**: revision 6: safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. Washington, DC, 2011.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. **Directive 7120.1 review from 4/6/2012**: safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry and eggs products. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/7120.1.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2012.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. **Guidance on the procedures for joint Food Safety and Inspection Service and Food and Drug Administration**: approval of ingredients used in the production of meat and poultry products. 2000. Disponível em: <www.fsis.usda.gov/opped/larc>. Acesso em: 12 maio 2011.

EUROPEAN COMMISSION. **Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on revision of meat inspection procedures**. União Européia, 2000.

FAIRBROTHER, J. M. et al. Neonatal *Escherichia coli* diarrhea. In: STRAW, B. E. et al. **Diseases of swine**. 8. ed. Iowa: AMES, 1999. p. 433-441

FEDORKA-CRAY, P. J.; GRAY, J. T.; WRAY, C. *Salmonella* infections in pigs. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). **Salmonella in domestic animals**. Oxford: Oxford University, 2000. p. 191-207

FEGAN, N. et al. An investigation of *Escherichia coli* O157 contamination of cattle during slaughter at an abattoir. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 68, n. 3, p. 451-457, 2005.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. H. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, MD, v. 85, n. 5, p. 1187-1200, may 2002.

FERREIRA, M. F. et al. Effect of water spraying on carcass decontamination. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGIES, 50., 2004, Helsink, Finlândia. **Anais...** Helsink, Finlândia, 2004.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FRANSEN, N. G. et al. Pathogenic micro-organisms in slaughterhouse sludge-a survey. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 33, n. 2-3, p. 245-256, 1996.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. et al. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 135, p. 199-202, 2009.

FRONDREVEZ, M. et al. Simplified method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pig tonsils. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdã, Holanda, v. 83, n. 2, p. 244-249, sept. 2010.

FRYDENDAHL, K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning with diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 85, p. 169-182, 2002.

FUNG, D. Y. C. Rapid methods and automation in microbiology: 25 years of developments and predictions. **Alimentaria: Revista de Investigación, Tecnología y Seguridad**, Madrid, p. 113-117, 2008.

GE, B.; MENG, J. Advanced technologies for pathogen and toxin detection in foods: current applications and future directions. **Technology review; JALA**, St. Charles, IL, p. 235-241, aug. 2009.

GILL C. O.; BRYANT, J. Decontamination of carcasses by vacuum-hot water cleaning and steam pasteurizing during routine operations at a beef packing plant. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, v. 47, n. 3-4, p. 267-276, 1997.

GILL, C. O.; LANDERS, C. Microbiological effects of carcass decontaminating treatments at four beef packing plants. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 65, p. 1005-1011, 2003.

GILL, C.O. et al. Decontamination of commercial, polished pig carcasses with hot water. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 12, p. 143-149, 1995.

GREEN, R. et al. **Evaluation of the TEMPO® System for total viable count, total coliforms and *E. coli* Enumeration in Meat and Poultry Products**. Durham: bioMérieux, 2007. Disponível em: <http://www.biomerieuxusa.com/upload/TVC%20TC%20and%20EC%20vs%20ISO%20in%20meat%20and%20poultry%20Campden-1.pdf>. Acesso em: 12 maio 2011.

GREGORY, N. G. Animal welfare at markets and during transport and slaughter. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 80, p. 2-11, 2008.

GUENTER, S. et al. Enterobacteriaceae populations during experimental *Salmonella* infection in pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 142, p. 352-360, 2010.

HALABI, M. et al. Prevalence of Shiga toxin, intimin and haemolysin genes in *Escherichia coli* isolates from drinking water supplies in a rural area of Austria. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Amsterdã, Holanda, v. 211, p. 454-457, 2008.

HARDIN, M. D. et al. Comparison of methods for decontamination from beef carcass surfaces. **Journal of Food protection**, Des Moines, IA, v. 58, p. 368-374, 1995.

HERRERA-LEÓN, S. et al. Molecular characterization of a new serovar of *Salmonella bongori* 13,22:z39: isolated from a lizard. **Research in Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 156, p. 597-602, 2005.

HEUVELINK, A. E. et al. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 52, n. 1-2, p. 67-75, 1999.

HUANG, C. et al. Development of a Modified Enrichment method for the Rapid Immunoassay of *Escherichia coli* O157 strains in fresh cut vegetables. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taiwan, v. 13. n. 1, p. 64-70, 2005.

HUFFMAN, R. D. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 62, p. 285-294, 2002.

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination: the role of the European Food Safety Authority. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 78, p. 43-52, 2008.

HUIS in 't VELD, J. H. J.; MULDER, R. W. A. W.; SNIJDERS, J. M. A. Impact of animal husbandry and slaughter technologies on microbial contamination of meat: monitoring and control. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, v. 36, n. 1-2, p. 123-154, 1994.

HUMPHREY, T.; JORGENSEN, F. Pathogens on meat and infection in animals: establishing a relationship using *campylobacter* and *Salmonella* as examples. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 74, p. 89-97, 2006.

HUSSEIN, H. S.; BOLLINGER, L. M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, v. 71, p. 676-689, 2005.

HWANG, C.; BEAUCHAT, L. R. Efficacy of lactic acid/sodium benzoate wash solution in reducing bacterial contamination of raw

chicken. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 27, p. 91-98, 1995.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in food 6: Microbial ecology of food commodities**. 2. ed. Nova York, 2005.

IRINO, K. et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 105, n. 1, p. 29-36, 2005.

JAKABI, M. et al. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in raw meat marketed in São Paulo city, Brazil, and evaluation of its cold tolerance in ground beef. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 238-242, 2004.

JASSON, V. et al. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 27, n. 6, p. 710-730, 2010.

JAYAWARDANA, B. C. et al. Removing of central nervous tissues from dressed carcasses: washing with a low concentration of lactic acid in spraying cabinet. **Food Control**, Amsterdã, Holanda, n. 20, p. 386-390, 2009.

JENSEN, T.; CHRISTENSEN, H. Decontamination of pig carcasses with Hot Water. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGIES, 50., 2004, Helsink, Finlândia. **Anais...** Helsink, Finlândia, 2004.

JOHNSON, R. BioMérieux TEMPO® EC Test Granted PTM Status. **Inside Laboratory Management**, Marcy l'Etoile, France, may/june 2007.

JOHNSON, R.; MILLS, J.; BEZZOLE, L. BioMérieux TEMPO® EB test Granted PTM Status. **Inside Laboratory Management**, Marcy l'Etoile, France, may/june 2009.

JOHNSON, R.; MILLS, J.; BEZZOLE, L. BioMérieux TEMPO® TVC test Granted PTM Status. **Inside Laboratory Management**. Marcy l'Etoile, France, may/june 2008.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING N. W. Sistema digestivo. In: _____ . **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 1063-1130.

JORDAN, E. et al. *Salmonella* surveillance in raw and cooked meat and meat products in the Republic of Ireland from 2002 to 2004.

International Journal of Food Microbiology, Amsterdã, Holanda, n. 112, p. 66–70, 2006.

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

KICH, J. D. et al. Fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 398-405, 2005.

KICH, J. D. et al. Prevalence, distribution and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 151, p. 307-313, 2011.

KOOHMARAIE, M. et al. Interventions to reduce/eliminate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 77, p. 90-96, 2007.

KOOHMARAIE, M. et al. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 71, p. 79-91, 2005.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and safety indicators. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC, 2001. cap. 8, p. 69-82.

- KUNICKA, A. Evaluation of the TEMPO® SYSTEM: an automated method for food microbiological quality control. **Journal of Biotechnology**, Amsterdã, Holanda, n. 131, p. 69-72, 2007.
- LARA, G. H. B. et al. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). **Research in veterinary Science**, Amsterdã, Holanda, n. 90, p. 185-188, 2011.
- LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. **Journal of Applied Microbiology**, New Jersey, v. 88, p. 729-745, 2000.
- LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- LAWSON, L. G. et al. Cost-effectiveness of *Salmonella* reduction in Danish abattoirs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 134, p. 126-132, 2009.
- LEE, G. Y. et al. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 134, p. 196-200, 2009.
- LEOMIL, L. et al. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 97, p. 103-109, 2003.
- LIMA, E. do S. C. et al. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 24, n. 4, p. 185-190, 2004.
- LO FO WONG, D. M. A. et al. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Production Science**, Amsterdã, Holanda, v. 76, n. 3, p. 215-222, 2002.
- LOMBARD, B.; LECLERCQ, A. Validation of innovative food microbiological methods according to the EN ISO 16140 standard. **Food Analytical Methods**, Berlin, v. 4, n. 2, p. 163-172, 2010.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, Amsterdã, Holanda, v. 45, n. 2, p. 713-721, mar. 2012.

MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P. N.; DROSINOS, E. H. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 126, p. 1-12, 2008.

MCMEEKIN, T. A. et al. Ecophysiology of food-borne pathogens: essential knowledge to improve food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 139, p. 64-78, 2010.

MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M. Pathogenic *Escherichia coli*. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC, 2001.

MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 45, p. 229-235, 1998.

MENG, J. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 3. ed. Washington, DC: ASM, 2007.

MENG, J. et al. Pathogenic *Escherichia coli*. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC, 2001.

MIELE, M.; MACHADO, J. S. Panorama da carne suína brasileira. **AgroAnalysis**, São Paulo, v. 30, n. 1, esp. Suinocultura p. 36-42, jan. 2010.

MOLDENHAUER, J. Overview of rapid microbiological methods. In: ZOUROB M.; ELWARY, S.; TURNER, A. P. F. **Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems**. Berlin: Springer, 2008.

- MORA, A. et al. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin): producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 156, p. 793-806, 2005.
- MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC, 2001. cap. 7, p. 63-67.
- MURMANN, L.; SANTOS, M. C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic, characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages. **Food Control**, Amsterdã, Holanda, n. 20, p. 191-195, 2009.
- NAKAO, H. et al. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, New Jersey, n. 34, p. 289-297, 2002.
- NAKAZAWA, M.; AKIBA, M.; SAMESHIMA, T. Swine as a potential reservoir of Shiga-Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, GA, v. 5, n. 6, nov./dec. 1999.
- NESBAKKEN, T.; SKJERVE, E. Interruption of microbial cycles in farm animals from farm to table. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, v. 43, p. 47-57, 1996.
- NESBAKKEN, T. et al. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 80, p. 231-240, 2003.
- NISSEN, H.; MAUGESTEN, T.; LEA, P. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella enteritidis* on decontaminated and untreated meat. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 57, p. 291-298, 2001.

O'LOUGHLIN, E. V.; ROBINS-BROWNE, R. M. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. **Microbes and Infection**, Amsterdã, Holanda, v. 3, p. 493-507, 2001.

OJO, O. E. et al. Potentially zoonotic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in the faeces and meat of food-producing animals in Ibadan, Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 142, p. 214-221, 2010.

OLIVEIRA, M. et al. Occurrence of *Salmonella* spp. in samples from pigs slaughtered for consumption: a comparison between ISO 6579:2002 and 23S rRNA Fluorescent in Situ Hybridization method. **Food Research International**, Amsterdã, Holanda, v. 45, n. 2, p. 984-988, 2010.

ORDOÑEZ, M. G. Ensaíos farmacológicos in vitro para evaluar actividad anti-giardíaca. **Revista Cubana de Farmacia**, La Habana, Cuba, v. 35, n. 1, p. 66-73, 2001.

OTEIZA, J. M. et al. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 23, p. 283-288, 2006.

OTERO, A.; GARCIA-LOPÉZ, M. L.; MORENO, B. Rapid microbiological methods in meat and meat products. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, v. 49, n. suppl. I, p. 179-189, 1998.

OWEN, M.; WILLIS, C.; LAMPH, D. Evaluation of the TEMPO® most probable number technique for the enumeration of Enterobacteriaceae in food and dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, New Jersey, v. 109, p. 1810-1816, 2010.

PANISELLO, P. J. et al. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 59, p. 221-234, 2000.

PARDI, M. C. **Memória da inspeção sanitária e industrial de produtos de origem animal no Brasil**: o Serviço de Inspeção Federal-SIF. Brasília: Columbia, 1996.

- PEARCE, R. A. et al. Studies to determine the critical points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 90, p. 331-339, 2004.
- PIPEK, P. et al. Color changes after carcasses decontamination by steam and lactic acid. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 69, p. 673-680, 2005.
- PIPEK, P. et al. Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid. **Journal of Food Engineering**, Amsterdã, Holanda, n. 74, p. 224-231, 2006.
- PRATA, C. B. **Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em bovinos abatidos em estabelecimento habilitado à exportação na cidade de Barretos-SP, Brasil**. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- REAGAN, J. O. et al. Trimming and washing of beef carcasses as a method of improving the microbiological quality of meat. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 59, n. 7, p. 751-756, 1996.
- REITER, M. G. et al. Comparative study of alternative methods for food safety control in poultry slaughterhouses. **Food Analytical Methods**, Berlin, v. 3, p. 253-260, 2010.
- RIVAS, T.; VIZCAINO, J. A.; HERRERA, F. J. Microbial contamination of carcasses and equipment from an Iberian pig slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 63, n. 12, p. 1670-1675, 2000.
- ROST, E. **Fotos de arquivo pessoal**. São Miguel do Oeste, 2010.
- ROTTA, A. **Fotos de arquivo pessoal**. Chapecó, 2010.
- SAIDE-ALBORNOZ, J. J. et al. Contamination of pork carcasses during slaughter, fabrication and chilled storage. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 58, n. 9, p. 993-997, 1995.

SANDRINI, C. N. M. et al. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 175-182, 2007.

SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO D. R. P. Comparação entre os métodos rápidos Simplater Tpc-Ci e Petrifilm^{Ac} e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de Aeróbios Mesófilos em sorvetes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 60-64, jan./abr. 2002.

SARDINHA, L. et al. Decontamination of swine carcasses with chlorine. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGIES, 47., 2001, Krakovia, Polonia. **Anais...** Krakovia, Polonia, 2001.

SARIMEHMETOGLU, B. et al. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. **Food Control**, Amsterdã, Holanda, v. 20, p. 357-361, 2009.

SCHWARZ, P. et al. *Salmonella enterica*: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 5, p. 1028-1034, 2009.

SCIENTIFIC Opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs. **European Food Safety Authority**, Parma, Italy, v. 8, n. 4, p. 1-90, 2010.

SCOTT, H. et al. Swine health impact on carcass contamination and human foodborne risk. **Public Health Reports**, Washington, DC, v. 123, may/june 2008.

SEIXAS, F. N.; TOCHETTO, R.; FERRAZ, S. M. Presença de *Salmonella* sp. em carcaças suínas amostradas em diferentes pontos da linha de processamento. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 2, p. 634-640, abr./jun. 2009.

SILBERNAGEL, K.; LINDBERG, K. G. 3MTM PetrifilmTM Enterobacteriaceae count plate method for enumeration of enterobacteriaceae in selected foods: collaborative Study. **Journal of**

AOAC International, Gaithersburg, MD, v. 86, n. 4, 2003. Disponível em: <http://www.3m.com/intl/kr/microbiology/regu_info/3.pdf>. Acesso em: 05 maio 2012.

SILBERNAGEL, K.M; LINDBERG, K. G. Evaluation of the 3M Petrifilm Enterobacteriaceae count plate method for the enumeration of Enterobacteriaceae in foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 65, n. 9, p. 1452-1456, sept. 2002.

SILVA, A. S. et al. *Escherichia coli* strains from edema disease: o serogroups and genes for Shiga toxin, enterotoxins and F18 fimbriae. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 80, p. 227-233, 2001.

SILVA, M. C. et al. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 266-268, jan./fev. 2009.

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**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 352-359, abr./jun. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n2/30183.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2012.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 223-227, maio/ago. 2001.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 167-173, maio/ago. 2003.

SILVEIRA, J. B. **Investigação de *Escherichia coli* O157:H7 em carne moída no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2010. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SMIGIC, N. et al. Intracellular pH as an indicator of viability and resuscitation of *Campylobacter jejuni* after decontamination with lactic

acid. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 135, p. 136-143, 2009.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e patologia suína**. 2. ed. Goiânia: Art 3, 1999.

SODERGARD, A.; STOLD, M. Properties of acid lactic based polymers and their correlation with the composition. **Progress in Materials Science**, Amsterdã, Holanda, v. 27, n. 6, p. 1123-1163, 2002.

SOFOS, J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, Amsterdã, Holanda, n. 78, p. 3-13, 2008.

SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SMITH, G. C. Nonacid meat decontamination technologies: model studies and commercial applications. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 44, p. 171-188, 1998.

SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SMITH, G. C. Processes to reduce contamination with pathogenic microorganisms in meat. INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGIES, 45., 1999, Yokohama, Japan. **Anais...** Yokohama, Japan, 1999. p. 596-605.

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**, Amsterdã, Holanda, n. 86, p. 2-14, 2010.

SOHIER D. et al. TEMPO® system: AFNOR validation according to the ISO 16140 standard 2006. **Inside Laboratory Management**, Marcy l'Etoile, France, may/june 2007.

SOHIER, D.; RANNOU, M.; GORSE, F. A. Développement, expert lab at the AFNOR validation committee, France, BioMérieux, France. TEMPO® system :AFNOR validation according to the ISO 16140 standard. 2006. Disponível em: <<http://www.biomerieux-usa.com/upload/ISO%2016140%20validation%20by%20AFNOR%20o n%20TVC,%20TC%20and%20EC,%20Adria-2.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2011.

SORRIBES, C. H. Métodos rápidos y automatización em microbiologia alimentaria. **Alimentaria**: Revista de Investigación, Tecnología y Seguridad, Madrid, p. 109-113, abr. 2008.

SPRICIGO, D. A. et al. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguiça frescal suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 779-785, out./dez. 2008.

STOPFORTH, J. D. et al. Influence of organic acid concentration on survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in beef carcass wash water and on model equipment surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 20, p. 651-660, 2003.

SWANENBURG, M. et al. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 70, p. 231-242, 2001.

TORLAK, E.; AKAN, I. M.; GOKMEN, M. Comparison of TEMPO® EC and TBX medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese. **Letters in Applied Microbiology**, New Jersey, n. 47, p. 566-570, 2008.

VAN NETTEN, P.; MOSSEL, D. A.; HUIS in 't VELD, J. H. J. Microbial changes on freshly slaughtered pork carcasses due to "hot" lactic acid decontamination. **Food Safety**, Ashtown, Dublin, n. 17, p. 89-111, 1997.

VAN NETTEN, P.; MOSSEL, D. A.; HUIS in 't VELD, J. H. J. Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses: a pilot plant study. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 25, p. 1-9, 1995.

VARELA-HERNÁNDEZ, J. J. et al. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, v. 113, p. 237-241, 2007.

VASCONCELOS, E. C. et al. A microbiota da carcaça e da carne ovina tratada com ácido acético embalada a vácuo e maturada por 48 dias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 272-277, 2002.

VELOSO, G. M. Microbiologia das carnes: parte I. In: GILL, J. I. **Manual de inspeção sanitária de carnes**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. v. 1.

VELUSAMY, V. et al. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, Amsterdã, Holanda, n. 28, p. 232-254, 2010.

VERNOZY-ROZAND, C. et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial minced beef. **Letters in Applied Microbiology**, New Jersey, v. 35, p. 7-11, 2002.

VERSETTI, D. et al. **Evaluation of the tempo® system for total viable count, total coliforms and e. coli enumeration in meat products**. Durham: bioMérieux, 2011. Disponível em: <[http://www.biomerieuxusa.com/upload/TVC%20TC%20and%20EC%20vs%20ISO%20in%20meat%20\(Inalca\)-1.pdf](http://www.biomerieuxusa.com/upload/TVC%20TC%20and%20EC%20vs%20ISO%20in%20meat%20(Inalca)-1.pdf)>. Acesso em: 12 maio 2011.

VIANNA, A. T. **Os Suínos: criação prática e econômica**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1974.

VIEIRA-PINTO, M. et al. Relationship between tonsils and mandibular lymph nodes concerning *Salmonella* sp. infection. **Food Research International**, Amsterdã, Holanda, v. 45, n. 2, p. 863-866, 2010.

WANI, S. A. et al. Subtype analysis of *stx*₁, *stx*₂ and *eae* genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from lambs in India. **The Veterinary Journal**, Amsterdã, Holanda, n. 182, p. 489-490, 2009.

WONG, T. L.; MACDIARMID, S.; COOK, R. *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* biotype 1 in a pilot survey of imported and new Zealand pig meats. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Holanda, n. 26, p. 177-182, 2009.