

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

***Salmonella* spp. E *Escherichia coli* VEROTOXIGÊNICA
(VTEC) EM CARCAÇAS DE BOVINOS DURANTE O
PROCESSAMENTO EM ABATEDOUROS-FRIGORÍFICOS**

Daniele Bier

CAMPO GRANDE, MS

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

***Salmonella* spp. E *Escherichia coli* VEROTOXIGÊNICA (VTEC) EM
CARCAÇAS DE BOVINOS DURANTE O PROCESSAMENTO EM
ABATEDOUROS-FRIGORÍFICOS**

Salmonella spp. and Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in
beef carcasses during processing slaughterhouses

Daniele Bier

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS

2016

Certificado de aprovação

DANIELE BIER

***Salmonella spp. e Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) em carcaças de bovinos,
durante o processamento em abatedouros-frigoríficos**

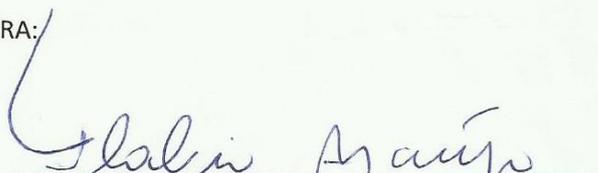
***Salmonella spp. and Verotoxin-producing E. coli* (VTEC)
in beef carcasses during processing in slaughterhouses**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de doutora em Ciência Animal.

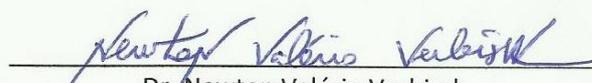
Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado(a) em: 02/12/2016

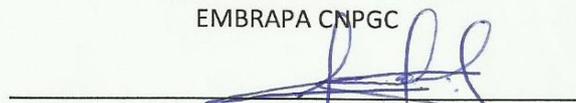
BANCA EXAMINADORA:



Dr. Flávio Ribeiro de Araújo
(EMBRAPA CNPGC) – (Orientador)



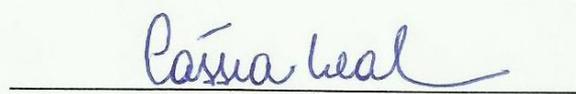
Dr. Newton Valério Verbisck
EMBRAPA CNPGC



Dr. Cleber Oliveira Soares
EMBRAPA CNPGC



Dra. Grácia Maria Soares Rosinha
EMBRAPA CNPGC



Dra. Cassia Rejane Brito Leal
UFMS

Dedico este trabalho aos meus pais, Jair e Geneci, e à minha irmã, Fabiana, pelo apoio incondicional diante das minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por todas as graças e bênçãos que Ele me concede.

Ao meu orientador, professor e pesquisador Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, pelas orientações, conversas, risadas, conselhos e, principalmente, pelos ensinamentos.

Aos meus pais, Jair e Geneci, por todo amor e dedicação e, principalmente apoio nas minhas decisões. A minha irmã, Fabiana, que mesmo longe, está sempre ao meu lado, me apoiando em todos os momentos. A minha linda afilhada Larissa que sempre me alegra e me estimula cada vez mais. E, ao meu cunhado, pelo apoio e conversas incentivadoras.

Ao meu marido Fernando por todo amor e carinho, e algumas orientações forçadas.

À minha amiga Renata, por estar sempre presente na minha vida e por todas as contribuições neste trabalho.

A todos os meus amigos que também me apoiam nas decisões e compreendem, muitas vezes, a minha ausência.

Aos amigos do LIA por fazerem os dias no laboratório mais divertidos.

Ao Dr. Newton, pela ajuda na realização do MALDI e nas considerações do trabalho, além de conversas, discussões e ensinamentos.

Aos pesquisadores Dra. Jalusa, Dra. Sabrina, Dr. Cleber e Dra. Carina pelas considerações e ajuda na correção do trabalho.

Ao Dr. Márcio pela imensa ajuda com a análise estatística dos artigos.

Ao pessoal do laboratório da FIOCRUZ, em especial a Dra. Dália, pela sorologia e ao pessoal da Embrapa Suínos e Aves, em nome da Dra. Jalusa, pela ajuda com o PFGE.

Às minhas alunas de graduação e iniciação científica por toda dedicação e pelo esforço conjunto no processamento das amostras no laboratório de microbiologia.

À UCDB, em nome da Mestre Regilene, e aos técnicos dos laboratórios do Biosaúde, pela disponibilidade do laboratório de microbiologia e a enorme ajuda com o material de consumo e as “tão disputadas” vidrarias.

Aos Fiscais Federais Agropecuários, aos Gerentes dos Controles de Qualidades e aos funcionários das Indústrias Frigoríficas, pela colaboração nas coletas, peças fundamentais para a realização desse trabalho.

Às minhas cachorrinhas Pisquilha (*in memoriam*), Pulguinha e Mel, que me deram muito carinho nas horas que não cabiam palavras.

Ao INCQS-Fiocruz pelo fornecimento das cepas de referência utilizadas nesse estudo.

À FUNDECT, pelo financiamento da pesquisa concedido para a realização do trabalho (processo 23/200.479/2014).

E, a todas as pessoas que, de alguma maneira, estiveram próximas ou torcendo para que eu obtivesse sucesso.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

Resumo

BIER, D. *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) em carcaças de bovinos durante o processamento em abatedouros-frigoríficos. 2016. 113 f./Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Inicialmente, apresenta-se uma breve revisão sobre a cadeia produtiva e microbiológica da carne bovina abordando as características gerais de *Salmonella* spp. e *E. coli* verotoxigênica e a presença dessas bactérias em carcaças bovinas, bem como os métodos de detecção desses patógenos em alimentos. Em seguida, relatam-se três trabalhos realizados com 270 amostras provenientes de 90 carcaças de bovinos, coletadas em três pontos da linha de abate (após a esfola, lavagem e refrigeração), em três abatedouros-frigoríficos exportadores no Estado de Mato Grosso do Sul. No primeiro estudo (artigo 1) foi realizada a pesquisa de *Salmonella* spp. nessas carcaças bovinas e avaliação do perfil de sensibilidade das cepas isoladas frente aos antimicrobianos. As contaminações das carcaças (n = 90) e amostras de carcaças (n = 270) por *Salmonella* spp. foram 6 (6,7%) e 7 (2,6%), respectivamente, e foi detectada em apenas um abatedouro-frigorífico. Todos os isolados foram confirmados por PCR e qPCR. A sorologia identificou três sorotipos diferentes: Heidelberg, Give e Typhimurium. No entanto, PFGE mostrou um único perfil: Typhimurium. As cepas apresentaram 100% de sensibilidade à ampicilina e tetraciclina. No segundo estudo (artigo 2), é apresentada a investigação de *E. coli* genérica e verotoxigênica e enumeração dos coliformes termotolerantes, além da avaliação do perfil de sensibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos. Das amostras de carcaças analisadas, 25 (9,3%) foram positivas após a esfola, 14 (5,2%) após a lavagem e 9 (3,3%) após a refrigeração. Em relação à enumeração de coliformes, 145 (53,7%) foram negativas (<3 NMP/mL) para a presença de coliformes termotolerantes, e 125 (46,3%) foram positivas, que variaram entre 4 e >1100 NMP/mL de coliformes termotolerantes. Os isolados de *E. coli* apresentaram alta sensibilidade a gentamicina e a ciprofloxacina. Nenhuma cepa de *E. coli* apresentou quaisquer um dos genes *stx1* e *stx2*, indicando não serem verotoxigênicas. O terceiro estudo (artigo 3) descreve a identificação dos isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* por espectrometria de massa MALDI-TOF, com o objetivo de introduzir essa técnica para incrementar o método tradicional microbiológico. Sete isolados bioquimicamente positivos para *Salmonella* spp. foram também classificados como pertencentes ao gênero *Salmonella* pelo MALDI, e, além disso, foram identificados como *S. enterica*. Quatro isolados apresentaram resultados inconclusivos nos testes bioquímicos para *Salmonella*, por apresentarem características fenotípicas não usuais e, foram identificados como pertencentes aos gêneros *Citrobacter* e *Proteus*. Em relação aos isolados de *Escherichia coli*, 37 foram positivos pelos testes bioquímicos para a espécie. A análise por MALDI Biotyper mostrou que, conforme esperado, todos os isolados foram classificados no gênero *Escherichia*, enquanto que para a identificação de espécie 30 dos 37 isolados foram confirmados, ou seja 81,1% dos casos.

Palavras-chave: carne, enterobactéria, matadouro, PCR, PFGE, MALDI-TOF.

Abstract

BIER, D. *Salmonella* spp. and Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in beef carcasses during processing slaughterhouses. 2016. 113 f./Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Initially, we present a brief review of the production and microbiological beef chain addressing the general characteristics of *Salmonella* and verotoxin-producing *E. coli* and the presence of these bacteria in beef carcasses, as well as the methods of detection of these pathogens in food. Then three studies are reported, conducted with 270 samples from 90 beef carcasses, collected in three slaughter line points (after skinning, after washing and after refrigeration) in three slaughterhouses exporters in the State of Mato Grosso do Sul. In the first study (Article 1) was performed of *Salmonella* spp. these beef carcasses and evaluation of the profile of sensitivity of strains isolated front to antimicrobials. The contamination of carcasses (n = 90) and meat samples (n = 270) for *Salmonella* spp. they were 6 (6.7%) and 7 (2.6%), respectively, and was only detected in an slaughterhouse. All isolates were confirmed by PCR and qPCR. Serology identified three different serotypes: Heidelberg, Give and Typhimurium. However, PFGE showed a single profile: Typhimurium. The strains showed 100% sensitivity to ampicillin and tetracycline. In the second study (Article 2), is presented research of generic and verotoxin-producing *E. coli* and enumeration of fecal coliforms, besides the evaluation of the sensitivity profile of the isolated front to antimicrobials. Of the samples, 25 (9.3%) were positive after skinning, 14 (5.2%) after washing and 9 (3.3%) after cooling. Regarding the enumeration of coliforms, 145 (53.7%) were negative (<3 NMP/mL) for the presence of fecal coliform, and 125 (46.3%) were positive, ranging from 4 to ≥ 1100 NMP/mL of fecal coliforms. The *E. coli* isolates showed high sensitivity to gentamicin and ciprofloxacin. No strain of *E. coli* showed any one of *stx1* and *stx2* genes, indicating not be verotoxigenic. The third study (Article 3) describe the identification of *Salmonella* and *E. coli* strains by MALDI-TOF to introduce this technique for incrementing the traditional microbiological method. Seven isolated biochemically positive for *Salmonella* spp. were also classified as belonging to the genus *Salmonella* by MALDI and, moreover, were identified as *S. enterica*. Four isolates showed inconclusive results in biochemical tests for *Salmonella*, with unusual phenotypic characteristics and were identified as belonging to *Citrobacter* and *Proteus* genera. Regarding *E. coli* isolates, 37 were positive by biochemical testing for species. Analysis by MALDI Biotyper showed that, as expected, all isolates were classified in the genus *Escherichia* while the species identification for 30 of the 37 isolates were confirmed, 81.1% of cases.

Keywords: meat, enterobacteria, slaughterhouse, PCR, PFGE, MALDI-TOF.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 CADEIA PRODUTIVA E QUALIDADE DA CARNE BOVINA	12
1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>Salmonella</i> spp	15
1.3 <i>Salmonella</i> spp. E A CONTAMINAÇÃO DA CADEIA DE PRODUÇÃO DA CARNE	17
1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>E. coli</i>	19
1.5 <i>Escherichia coli</i> verotoxigênica (VTEC) EM CARCAÇAS BOVINAS	22
1.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> e <i>Escherichia coli</i> verotoxigênica	22
1.6.1 Métodos de detecção de <i>Salmonella</i> spp.	22
1.6.2 Métodos de detecção de <i>Escherichia coli</i> verotoxigênica	27
1.7 OBJETIVOS	30
1.7.1 Objetivo Geral	30
1.7.2 Objetivos Específicos	30
REFERÊNCIAS	31
ARTIGO 1 – <i>Salmonella</i> spp. em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouros-frigoríficos exportadores	52
ARTIGO 2 – Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> verotoxigênica (VTEC) e coliformes termotolerantes em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouros-frigoríficos exportadores	71
ARTIGO 3 – Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Escherichia coli</i> isolados de carcaças bovinas	96

1 INTRODUÇÃO

A carne é um dos alimentos mais importantes da dieta da população e possui importância fundamental para a economia do Brasil, que é um grande produtor mundial de proteína animal e o maior exportador de carne bovina do mundo (BRASIL, 2016a). Porém, a carne e seus derivados são considerados um dos principais responsáveis pela veiculação de patógenos ao homem (BORCH; ARINDER, 2002; RHOADES et al., 2009), ocasionando as chamadas doenças transmitidas por alimentos (DTAs).

No Brasil, segundo dados da Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, no período de janeiro de 2007 a junho de 2016, foram notificados 6.632 surtos de DTAs, com 118.104 doentes e 109 óbitos. Desses surtos, apenas 29,7% tiveram o agente etiológico elucidado, sendo a grande maioria causada por bactérias, das quais *Salmonella* sp. foi o principal agente responsável dos surtos, seguido de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2016b).

A contaminação dos alimentos promove um enorme impacto social e econômico nos países. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças causadas por essa contaminação geram prejuízos estimados de US\$ 35 bilhões por ano nos Estados Unidos, considerando gastos diretos e perda de produtividade (WHO, 2007). Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil, durante o período de 1999 a 2004, aproximadamente 3,4 milhões de pessoas foram internadas em decorrência das DTAs, gerando um gasto médio anual de 46 milhões de reais. As infecções causadas apenas pela bactéria *Salmonella* spp. provocam despesas que chegam a US\$ 1 bilhão com custos diretos e indiretos (BRASIL, 2005).

A contaminação microbiológica das carcaças bovinas ocorre, principalmente, durante o processamento e manipulação, como esfola, evisceração, cortes, embalagem, estocagem e distribuição (BORCH; ARINDER, 2002; JAY et al., 2005). A esfola é considerada um ponto crítico do abate, devido à possibilidade de contaminação da superfície da carcaça com microrganismos presentes na pele, pelos e cascos dos animais (LAMBERT et al., 1991). As fezes são consideradas uma das principais fontes de contaminação da carcaça, por deposição direta pela pele ou por contato indireto (BORCH; ARINDER, 2002). A contaminação cruzada de

bactérias patogênicas, por meio de utensílios utilizados na manipulação dos alimentos, é também reconhecida como veículo de contaminação ao longo da cadeia produtiva da carne e fator importante para o desenvolvimento das doenças de origem alimentar (CHEN et al., 2001; PEREZ-RODRIGUEZ et al., 2010). Estudos demonstram a contaminação sequencial dos produtos cárneos, por meio da transferência de bactérias patogênicas, após a contaminação inicial com diferentes níveis de inóculos bacterianos entre diferentes utensílios e equipamentos de processamento (PEREZ-RODRIGUEZ et al., 2010; PAPADOPOULOU et al., 2012).

Segundo a OMS, *Salmonella* sp. é um dos microrganismos patogênicos de maior relevância na carne bovina, sendo sua presença indicativa de risco ao consumidor (WHO, 2005). De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, *Salmonella* ser. Typhimurium foi o sorovar mais frequentemente associado ao consumo de carne de aves, suínos e bovinos contaminados (EFSA, 2006). Da mesma forma, *E. coli* O157 verotoxigênica tem sido associada com surtos graves e é amplamente reconhecida como um importante patógeno ameaçador desde a década de 1980 (DUFFY et al., 2006). *Escherichia coli* O157 é uma das principais bactérias que podem contaminar a carne, e podem ser potencialmente transferidos do intestino do animal ou do couro durante o abate (DUFFY et al., 2006). Além disso, *E. coli* O157 pode sobreviver por horas ou dias em mãos, panos ou utensílios, conduzindo a uma potencial contaminação cruzada em casos de incorretas práticas de higiene (CHEN et al., 2001; KUSUMANINGRUM et al., 2003).

Preocupados com a segurança dos alimentos e considerando o próprio animal como principal fonte de contaminação da carne, as empresas implementaram programas de qualidade durante os processos de abate como Boas Práticas de Fabricação (BPF), Programa de Redução de Patógenos - PRP e o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC (HACCP - *Hazard Analysis of Critical Control Points*) (ALMEIDA, 2001). Porém, mesmo com a implantação desses programas de qualidade, é difícil correlacionar os limites de contaminação com os impactos possíveis à saúde pública, principalmente em países com escassos dados epidemiológicos.

Visando auxiliar nessa situação, a Organização Mundial do Comércio - OMC, por meio do Acordo Sanitário e Fitossanitário, e a OMS, recomendaram a aplicação de uma nova ferramenta para avaliar o impacto dos microrganismos contaminantes

de alimentos na saúde da população, chamada de Análise de Risco (CODEX ALIMENTARIUS, 1999).

Entretanto, segundo Sant'ana e Franco (2009), na maioria dos países, inclusive o Brasil, é difícil realizar a avaliação de risco microbiológico devido às inúmeras lacunas existentes, principalmente devido à escassez de dados quantitativos e qualitativos dos pontos de contaminação e prevalência dos microrganismos patogênicos relevantes na cadeia de produção de carnes. Além disso, a baixa prevalência da contaminação do gado por cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas (VTEC), do sorogrupo O157:H7 encontrada em diversos trabalhos pode ser devida a amostragens e métodos de detecção inadequados (BROSETA et al., 2001).

Nesse contexto, o monitoramento de microrganismos patogênicos no abate e processamento dos produtos de origem animal é necessário para fornecer informações quanto às condições sanitárias desse item da cadeia alimentar. Para produção e exportação de produtos cárneos de qualidade, é fundamental o desenvolvimento de estudos quantitativos e qualitativos relacionados à segurança microbiológica. A identificação da presença de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Salmonella* e *E. coli*, nas carcaças de bovino durante as operações de abate e nos produtos cárneos, pode contribuir, de forma significativa, com a implantação de programas de monitoramento da qualidade e de medidas preventivas e, conseqüentemente, com a redução de riscos à saúde do consumidor.

1.1 CADEIA PRODUTIVA E QUALIDADE DA CARNE BOVINA

Atualmente, o Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo e está nessa liderança desde 2008 (BRASIL, 2016a), somando o volume de exportação, no ano de 2015, de 1,4 milhão de toneladas e receita bruta de US\$ 5,93 bilhões, valores que representam uma participação de 28% do comércio internacional, exportando para mais de 170 países em diversas regiões do mundo como América Latina, Oriente Médio, Rússia, União Europeia e África (ABIEC, 2016).

O aumento das exportações da carne bovina brasileira está diretamente relacionado ao desenvolvimento de novas tecnologias para o setor, como melhoramento genético, inseminação artificial e sistemas produtivos mais saudáveis e sustentáveis, aliado ao rigoroso monitoramento das condições higiênico-sanitárias do rebanho.

Diante desse contexto de crescimento das exportações da carne bovina brasileira, Mato Grosso do Sul apresenta participação expressiva. O Estado tem o quarto maior rebanho de bovinos do País e está em segundo lugar no número de bovinos abatidos, com um abate anual de 3,9 milhões e um peso acumulado das carcaças de 849 mil toneladas. No cenário das exportações de carne do país, o Estado representa 9,4% do total da carne bovina brasileira, exportando principalmente para Hong Kong, China, Egito, Rússia, Irã, Venezuela, Chile, Itália, Vietnã e Holanda (BRASIL, 2016a).

Nessa significativa participação de Mato Grosso do Sul na produção de carne bovina, o Estado conta com um número relevante de plantas frigoríficas, cadastradas na categoria matadouro-frigorífico sob o Serviço de Inspeção Federal (SIF). De acordo com os dados cadastrados no Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal (SIGSIF), o MS conta com 30 unidades frigoríficas para abate de bovinos (SIF) que se distribuem por 22 municípios do Estado. Na capital, Campo Grande, encontram-se duas unidades em atividade, sendo uma considerada de modelo e referência, estando as demais distribuídas pelo interior (SIGSIF, 2016).

Apesar da expressividade do país na produção e exportação da carne, as análises do governo para este segmento referem as demandas sanitárias como os principais condicionantes no desenvolvimento da pecuária no Brasil devido a diversidade de doenças e dos prejuízos e desdobramentos que elas podem causar e pela possibilidade da presença de patógenos na carne bovina. Um exemplo disso foi a restrição norte-americana à carne brasileira nos últimos 17 anos, que era focada na saúde animal e estava relacionada às questões sanitárias do Brasil (BRASIL, 2016c).

A grande variação de mercados importadores estabelece diferentes padrões de qualidade e higiene que devem ser atingidos. De maneira geral, a carne destinada ao mercado externo deve ser analisada quanto à presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos, podendo-se limitar a comercialização

desses produtos quando não atingidos os critérios microbiológicos estabelecidos pelos países importadores. Os sistemas de controle de qualidade utilizam diversos microrganismos indicadores, como os aeróbios mesófilos e coliformes, por meio de diferentes parâmetros microbiológicos, a fim de verificar a qualidade e inocuidade final dos produtos obtidos na produção de carne bovina. Os Estados Unidos, por exemplo, determinam a realização diária de testes microbiológicos para pesquisa de *E. coli* e *Salmonella* spp., enquanto a União Europeia exige a enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos e enterobactérias, além da pesquisa de *Salmonella* spp. (COMMISSION REGULATION – EU, 2007). No Brasil, os padrões microbiológicos são estabelecidos de acordo com a RDC nº. 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o comércio interno e são seguidos de acordo com o mercado importador para o comércio internacional (BRASIL, 2001). Segundo os padrões microbiológicos da ANVISA, a exigência é apenas para carnes resfriadas, ou congeladas, *in natura*, de bovinos (carcaça inteiras ou fracionadas, quartos ou cortes), devendo apresentar ausência de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2001), não sendo exigido a enumeração de microrganismos indicadores de higiene, como *E. coli* nem coliformes termotolerantes.

Neste ano de 2016, o Brasil assinou um acordo de reciprocidade para exportar carne bovina *in natura* (fresca e congelada) para os Estados Unidos, que era esperado desde 1999. Os frigoríficos interessados podem pedir a habilitação ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), desde que já atuem sob o SIF, sendo o aval dado para o estabelecimento pelos EUA (BRASIL, 2016c). Os embarques começaram em setembro desse ano e, até o momento, cinco indústrias brasileiras foram habilitadas, sendo dois frigoríficos de Mato Grosso do Sul. Até agora, dois contêineres com o produto saíram com destino ao país, sendo os dois do Estado. O primeiro deles, foi embarcado no município de Bataguassu, e o outro, da capital, Campo Grande (BRASIL, 2016c).

Os EUA já importavam carne bovina brasileira, porém, apenas industrializada, e lideravam o ranking de importação dessa categoria. Apenas de janeiro a junho desse ano, foram enviadas mais de 15 mil toneladas, resultando em um faturamento de US\$ 130 milhões (ABIEC, 2016). Como os Estados Unidos são exigentes e servem de referência para o mercado externo, o acordo deve abrir novas portas para o produto brasileiro, como o Canadá, o mercado do Japão e o mercado da Coreia.

Dessa forma, pesquisas em análises de risco e avaliação dos possíveis microrganismos patogênicos que podem ser isolados no abate e no processamento da carne são fundamentais para o fornecimento de informações úteis para garantir a qualidade e segurança microbiológica da carne, cumprir os padrões internacionais, garantir a posição do Brasil como maior exportador de carne bovina do mundo, além de assegurar um produto inócuo para o consumidor.

A qualidade dos produtos cárneos pode ser estimada por meio da pesquisa de diversos indicadores, como os aeróbios mesófilos e os coliformes. A enumeração desses indicadores fornece uma estimativa da população geral de microrganismos que estão presentes nos alimentos, e altos níveis de contaminação estão associados à baixa qualidade (GILL et al., 1998; JAY et al., 2005), e à maiores chances de contaminação por patógenos como *Salmonella* e *E. coli* (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A pesquisa desses patógenos frequentemente associados à carne bovina é fundamental para garantia da segurança microbiológica de produtos cárneos e para evidenciar os riscos que estes produtos podem representar para os consumidores.

O modo mais eficiente de se reduzir a contaminação e o desenvolvimento microbiano é o estabelecimento de programas preventivos de controle de qualidade como BPF e APPCC, que são validados por meio da pesquisa de microrganismos indicadores de higiene, que verificam as práticas inadequadas de processamento e a presença de patógenos e microrganismos causadores de deterioração (JAY et al., 2005).

1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e é composto por bacilos Gram-negativos, que medem de 0,7 a 1,5 µm de largura por 2 a 5 µm de comprimento. Apresenta uma taxonomia complexa com vários sistemas empregados para seu estudo. A nomenclatura e classificação do gênero sofreram várias modificações durante o decorrer dos anos, sendo mais aceita a classificação baseada nos estudos de hibridação do DNA, dividindo o gênero em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (LE MINOR; POPOFF, 1987; POPOFF; LE MINOR, 2005).

Salmonella enterica é dividida em seis subespécies, definidas por suas características bioquímicas e antigênicas, expressas por nomes e algarismos romanos: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (POPOFF; LE MINOR, 2005, GRIMONT; WEILL, 2007).

O gênero contém atualmente 2579 sorovares, identificados com base na caracterização dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H), segundo esquema descrito por Kauffmann-White (GRIMONT; WEILL, 2007). De cinco em cinco anos, este esquema é revisado pelo Centro Colaborador para Referência e Pesquisa em *Salmonella* da Organização Mundial da Saúde (Instituto Pasteur, Paris, França) (POPOFF; LE MINOR, 1997; GRIMONT; WEILL, 2007).

A patogenicidade de *Salmonella* spp. depende de vários fatores de virulência, como plasmídeos, toxinas, fimbrias e flagelos. Os fenômenos envolvidos na virulência desse microrganismo ainda não são totalmente esclarecidos, mas sabe-se que a maioria dos genes de virulência está agrupada em regiões específicas do cromossomo da bactéria, designadas de ilhas de patogenicidade ou, em inglês, de *Salmonella Pathogenicity Island* – SPI. Sugere-se que esses genes tenham sido adquiridos de outros gêneros bacterianos por transferência horizontal (OHL; MILLER, 2001, VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005), podendo ter levado ao aumento da patogenicidade da *Salmonella*. Um total de doze ilhas de patogenicidade diferentes (denominadas SPI-1 a SPI-12) já foram descritas, associados com a capacidade de invasão da célula hospedeira e patogênese intracelular (PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006).

A ocorrência de surtos associados a *Salmonella* spp. aumenta consideravelmente com o decorrer dos anos, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Espécies desse gênero são os patógenos mais frequentemente associados às doenças de origem alimentar, em países como: Áustria (MUCH et al., 2009); Brasil (JAKABI et al., 1999; TAVECHIO et al., 2002; GEIMBA et al., 2004; NADVORNY et al., 2004; VAN AMSON et al., 2006); Estados Unidos (GERNER-SMIDT; WHICHARD, 2007); Espanha (DOMÍNGUEZ et al., 2007); Inglaterra e Gales (HUGHES et al., 2007); Japão (KUBOTA et al., 2008), e outros (GREIG; RAVEL, 2009).

As espécies de *Salmonella* infectam os hospedeiros por contaminação fecal-oral. Elas resistem a ambientes com baixo pH, como o estômago e, podem invadir vários sítios do epitélio intestinal. A disseminação do patógeno no organismo é

facilitada por sua capacidade de multiplicação dentro dos macrófagos, pelo transporte por meio do sistema retículo-endotelial (FOLEY; LYNNE, 2008).

Os sintomas associados às salmoneloses incluem dor abdominal, diarreia, vômito e febre (D'AOUST; MAURER, 2007), ocorrendo, em média, 12 a 36 horas após o consumo do alimento contaminado. A dose infectante e o período de incubação podem variar, principalmente, em relação ao sorovar envolvido, oscilando entre 10^5 a 10^8 células bacterianas, entretanto, em pacientes imunocomprometidos, a dose pode ser $\leq 10^3$ células (BRASIL, 2011). *Salmonella* multiplica-se em temperatura que varia de 5 °C à 45 °C, e apresentam a temperatura ótima de crescimento em torno de 37 °C e o pH ótimo de 7,5, com variação de 4,5 a 9,0 (VARNAM, 1991).

Na maioria das vezes, o quadro diarreico é moderado e sem a presença de sangue, mas, em alguns casos, pode ocorrer tenesmo e sangue nas fezes (FOLEY; LYNNE, 2008). Infecções por *Salmonella* spp. podem ser graves, sobretudo em crianças, idosos e imunossuprimidos, que podem apresentar infecções extra intestinais como septicemia, osteomielite, pneumonia, além de outras enfermidades (D'AOUST; MAURER, 2007). A doença é autolimitada na maioria dos casos, porém o tratamento com antibióticos pode ser indispensável em casos graves (FOLEY; LYNNE, 2008).

1.3 *Salmonella* spp. E A CONTAMINAÇÃO DA CADEIA DE PRODUÇÃO DA CARNE

A contaminação da cadeia de produção de animais com *Salmonella* spp. pode ocorrer por meio da água, ração, entrada de outros animais infectados no rebanho e até mesmo por animais silvestres. Durante o abate, pode ocorrer a contaminação de carcaças pelo contato com microrganismos presentes na pele, pelos e cascos dos animais ou com material do trato intestinal durante a esfolagem, evisceração, cortes, embalagem, estocagem e distribuição da carne (LAMBERT et al., 1991; BORCH; ARINDER, 2002; JAY et al., 2005). A contaminação de carcaças é a principal causa de infecções humanas de origem alimentar (PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006). Em alguns países, a carne suína e seus derivados são considerados as principais fontes

de *Salmonella* spp., superados apenas pelos produtos de origem avícola. A contaminação de aves e suínos com a bactéria pode ocorrer antes do processamento e também pela contaminação cruzada durante o processamento (LO FO WONG et al., 2002).

A prevalência de *Salmonella* spp. na carne bovina é bastante variável e depende de inúmeros fatores, como: condições climáticas, tipo de manejo, condições de abate e de armazenamento e transporte das carcaças. A ocorrência do microrganismo nas fezes de bovinos pode ser baixa (0,2% a 5,5%), porém, amostras da pele desses animais já demonstraram prevalências de até 91% (BOSILEVAC et al., 2009; RHOADES et al., 2009). Na carne moída de bovinos, as ocorrências de espécies de *Salmonella* variam de 0,4 a 4% (RHOADES et al., 2009). Contaminação cruzada e práticas incorretas de higiene alimentar estão frequentemente associadas a contaminação pelo agente em carne bovina, dificultando principalmente a identificação da fonte primária de infecção (PEREZ-RODRIGUEZ et al., 2010).

Inúmeros estudos demonstraram a presença de *Salmonella* na carne bovina, com diferentes resultados encontrados. Diversos trabalhos mostram baixa prevalência da bactéria na carne, como o estudo realizado na Austrália sobre a qualidade da carcaça e da carne desossada que avaliou 1.275 amostras coletadas de estabelecimentos exportadores e que forneciam carne para o mercado interno, sendo detectada a presença de *Salmonella* em 0,2% das carcaças e em 0,1% das carnes desossadas. (PHILLIPS et al., 2001). Em um trabalho realizado na Irlanda do Norte com 200 carcaças de bovinos, foram encontradas apenas três amostras positivas para a enterobactéria (MADDEN et al., 2001). Ao analisarem 1002 amostras de carne moída de bovinos abatidos no Canadá, Sorensen et al. (2002) encontraram 13 (1,3%) positivas para *Salmonella* spp.

Porém, alguns trabalhos demonstram uma prevalência bastante aumentada. Avaliando dois abatedouros em Botsuana, na África, Motsoela et al. (2002) encontraram prevalência de *Salmonella* spp. de 28% em 250 amostras e 23% em 300 amostras. Na pesquisa realizada por Brichta-Harhay et al. (2007) em abatedouros - frigoríficos nos Estados Unidos para verificar a eficácia dos métodos de detecção e enumeração de *Salmonella*, tanto em carcaças quanto em pele bovina, foram encontradas pelo método de detecção, prevalência de *Salmonella* de 49,8% (757) para carcaças e de 89,6% (2721) para o couro dos animais.

A União Europeia constatou que salmonelose foi a segunda mais importante zoonose em 2005, com uma incidência de 38,2 casos por 100.000 habitantes. Carnes e produtos cárneos foram importantes fontes dessa contaminação (NORRUNG; BUNCIC, 2008). Os sorovares de *Salmonella* responsáveis pelas enfermidades são na sua maioria pertencentes à espécie *S. enterica* subsp. *enterica*. Os sorovares mais comuns associados às infecções humanas são *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (GALANIS et al., 2006), porém, variam de acordo com a região estudada. Em alimentos, o sorovar mais frequentemente isolado é *S. Enteritidis* (TAVECHIO et al., 1996; MÜRMAN et al., 2009).

Dados do isolamento de cepas de *Salmonella* spp, no período de 2000 a 2004, compilados de diversos países participantes do programa da OMS para reduzir a gravidade de enfermidades transmitidas por alimentos, o *WHO Global Salm-Surv*, demonstraram que o sorovar mais comum isolados de humanos foi *S. Enteritidis* e em amostras não humanas, *S. Typhimurium* (GALANIS et al., 2006).

1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, não esporulada, pertencente à família Enterobacteriaceae. Faz parte da microbiota do trato digestivo de mamíferos e aves. Porém, algumas cepas dessa espécie possuem potencial patogênico e causam distintas síndromes diarreicas, sendo divididas em diferentes grupos com base nas características clínicas e epidemiológicas distintas, propriedades virulentas específicas e associações com certos sorotipos. Os grupos virulentos reconhecidos são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou verotoxigênica (VTEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (SCALETSKY et al., 1984; NATARO; KAPER, 1998; TENG et al., 2004; VIDAL et al., 2005). Há também sorotipos não diarreiogênicos, que causam infecções extra intestinais (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000), septicemia e meningite (MNEC) e infecções extra-intestinais em unidades de tratamento intensivo (UPEC) (KAPER et al., 2004; CAPRIOLI et al., 2005).

Desses diferentes tipos de *E. coli* patogênicas, a cepa verotoxigênica (VTEC) ou enterohemorrágica (EHEC) é considerada um dos patógenos mais importantes, por serem encontradas no trato digestivo de bovinos e causarem enfermidades graves em seres humanos. *E. coli* verotoxigênica, particularmente dos sorogrupos O157:H7, responde por milhares de casos de diarreia aquosa sanguinolenta com desenvolvimento da colite hemorrágica e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), principalmente nos Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Europa e Japão (HOLFINGER et al., 1998; MORABITO et al., 1998; SILVA et al., 2001; IRINO et al., 2002; GUTH et al., 2003).

A linhagem enterohemorrágica de *E. coli* produz duas enterotoxinas responsáveis pelas manifestações clínicas, denominadas SLT-I e SLT-II (Toxina Shiga Like), também conhecidas como Verotoxinas (VT-1 e VT-2) e toxina de Shiga (Stx-1 e Stx-2), que são toxinas potentes, codificados pelos genes *stx1* e *stx2*, semelhante à toxina Shiga produzida pela *Shigella dysenteriae* (STROCKBINE et al., 1988; JAY et al., 2005). Essas shigatoxinas (Stx) são os fatores de virulência essenciais na patogênese de EHEC. Além dessas duas toxinas, outros fatores de virulência importantes são: a adesina intimina, codificada pelo gene cromossomal *eaeA* (*E. coli attachment effacement*), essencial para adesão da bactéria às células intestinais e colonização do organismo hospedeiro (KAPER et al., 1998; JAY et al., 2005), a enterotoxina EAST codificada pelo gene cromossomal *ast* e uma enterohemolisina (EHEC-Hly ou Ehx), codificada pelo gene *hly*, também denominado por alguns autores de gene *ehxA*, causadora de hemólise, produzida pela maioria das EHEC isoladas de casos de colite hemorrágica e SHU (LEVINE, 1987; NATARO; KAPER, 1998; COOKSON et al., 2002). Apesar dessa forte associação entre a produção de enterohemolisina e de Stx com a colite hemorrágica e a SHU (SCHMIDT et al., 1995), o papel da enterohemolisina na patogenicidade das cepas portadoras ainda não está elucidado (MAINIL; DAUBE, 2005; SAITOH et al., 2008).

Diversos estudos demonstram que *E. coli* O157 é o principal agente etiológico em casos de diarreia associada à síndrome urêmica hemolítica, uma das principais causas de insuficiência renal aguda em crianças (CHANG et al.; 2004) e que esse é o principal sorotipo produtor de toxinas Shiga, causando aproximadamente 73.480 casos de infecção e 61 mortes a cada ano nos EUA (RAZZAQ, 2006).

VTEC é isolada nas fezes de muitos animais, incluindo ruminantes (bovinos, ovinos e bubalinos) e não ruminantes (equinos, caninos e suínos) (RIVAS et al.,

2008). A maioria dos casos e dos surtos causados por essa linhagem de *E. coli* tem sido atribuída ao consumo de carne bovina e suína (STEPHAN; SCHUMACHER, 2001; IRINO et al., 2004).

Vários alimentos já foram incriminados em surtos de VTEC, como leite cru, produtos cárneos fermentados, queijos, sucos não pasteurizados, frutas e vegetais (GYLES, 2007; KARMALI et al., 2009), entretanto o maior risco está associado ao consumo de carne bovina (NATARO; KAPER, 1998; KARMALI et al., 2009).

Os bovinos são considerados os principais transmissores e veiculadores de VTEC, pois, dificilmente apresentam sintomas, e eliminam os microrganismos continuamente pelas fezes, contaminando o ambiente e os alimentos produzidos (PHILLIPS, 1999). A transmissão para seres humanos pode ocorrer por contato direto com bovinos infectados, ou por consumo de alimentos e água contaminados, sendo esta última a forma mais comum associada aos casos e surtos de infecções (SYNGE, 2000; JAY et al., 2005).

Diferentes quadros clínicos são observados em seres humanos decorrentes da infecção por VTEC: quadros de diarreia, sem ou com presença de sangue (colite hemorrágica), cujo período de incubação é de 3 a 4 dias podendo durar 5 a 10 dias, e serem acompanhados de dores abdominais, febre baixa e vômito. A Síndrome Hemolítica Urêmica, caracterizada por manifestações de insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica (LÓPEZ et al., 2000), apresenta uma taxa de mortalidade entre crianças de 5% (RIVAS et al., 2006).

No Brasil, a frequência de infecções humanas causadas por VTEC é baixa, porém, as cepas de *E. coli* verotoxigênicas têm sido detectadas, principalmente, em amostras de fezes de bovinos (CERQUEIRA et al., 1999; LEOMIL et al., 2003; AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; FARAH et al., 2007; TIMM et al., 2007) e carcaças de bovinos (RIGOBELLO et al., 2008).

1.5 *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) EM CARCAÇAS BOVINAS

Diversos estudos demonstram a presença de EHEC O157:H7 em produtos cárneos bovinos, com grande variação de prevalências. Em um estudo realizado ao longo de um ano na Inglaterra, os autores isolaram *E. coli* O157 em 12,9% dos

bovinos, 1,4% das carcaças e em 0,44% dos produtos cárneos (CHAPMAN et al., 2001). Na Suíça, no estudo realizado por Fantelli e Stephan (2001), isolou-se cepas de *E. coli*, que apresentavam os genes produtores de Shiga toxina, *stx1* e *stx2*, em 2,3% de amostras de carne picada. Carney et al. (2006), relatam o isolamento de VTEC, apresentando importantes genes associados à patogenicidade, em 2,4% das amostras de cortes bovinos analisadas. Em estudo realizado no Brasil e Argentina, a maioria dos isolados de *E. coli* verotoxigênicas apresentaram o gene *stx2* (GUTH et al., 2003). Na Itália, um estudo realizado por Alonso et al. (2007), detectou 24% de positividade para *E. coli* O157:H7 em amostras de fezes de bovinos abatidos e 11% nas carcaças durante o abate.

Em alguns estudos, porém, não se isolou *E. coli* O157:H7 em nenhuma das carcaças bovinas e produtos cárneos analisados, como aqueles conduzidos por Madden et al. (2001), na Irlanda do Norte, e por Silva et al. (2001), no Brasil. Essas baixas prevalências ou ausência de isolamento são explicadas por vários autores, que analisaram criticamente os resultados de 26 estudos epidemiológicos publicados sobre a prevalência da contaminação do gado por cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas (VTEC), do sorogrupo O157:H7, argumentado que a prevalência dos valores inferidos foi, provavelmente, subestimada devido a amostragens e métodos de detecção inadequados (BROSETA et al., 2001).

1.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Salmonella* e *Escherichia coli* verotoxigênica

1.6.1 Métodos de detecção de *Salmonella* spp.

Os métodos convencionais de detecção de *Salmonella* em alimentos são ainda considerados como oficiais em diversos países (APHA, 1992; ISO, 2002; FDA, 2014) e no Brasil (BRASIL, 2003). A metodologia oficial disponível para detecção de *Salmonella* em carcaças de bovinos pelo método microbiológico tradicional envolve etapas de cultura onerosas e bastante trabalhosas, e necessitam de até sete dias para a confirmação dos resultados. Além disso, esses métodos tradicionais são propensos a erros.

Nessa metodologia tradicional, são necessárias as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo diferencial e confirmação bioquímica e sorológica. Essas etapas servem para aumentar a recuperação das células nos alimentos que possuem microbiota competitiva, células em número reduzido ou injuriadas (BAGER; PETERSEN, 1991; RALL et al., 2005).

Os testes bioquímicos permitem a identificação a partir do perfil metabólico do isolado. Porém, de acordo com Marin et al. (2006), as propriedades fenotípicas pelas quais as salmonelas são identificadas podem não ser expressas, e quando são, podem ser de difícil interpretação e classificação. Além disso, existe possibilidade de reações falso-negativas, devido à ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, além do risco de interpretações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes. E, se aumentar o número desses testes bioquímicos, haverá um acréscimo no custo da análise (FARBER et al., 2001; MARIN et al., 2006; SETTANNI; CORSETTI, 2007).

Métodos de diagnóstico rápidos são necessários em indústria de alimentos, principalmente de origem animal, que geralmente contém uma vida de prateleira curta, visando diminuir a perda econômica com alimentos retidos e recolhidos.

Diversos métodos rápidos para detecção de *Salmonella* são comercialmente disponíveis e podem ser divididos em várias categorias, como procedimentos convencionais adaptados ou modificados, ensaios baseados em imunologia, e ensaios baseados em ácidos nucleicos. Destes métodos, ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) mostram especificidade e sensibilidade comparável aos métodos convencionais. A sensibilidade e especificidade destes métodos dependem, em grande parte, da microflora do produto, matriz da amostra, presença de células não cultiváveis, e substâncias inibidoras como gorduras, proteínas, polissacarídeos, metais pesados, antibióticos e compostos orgânicos (LEE et al., 2015).

A aplicação da PCR na detecção de *Salmonella* em alimentos contaminados pode ser uma estratégia eficiente, rápida e precisa (HASSAN et al., 2004). As vantagens desta técnica se dão pela rapidez dos resultados, precisão e sensibilidade do teste (BENNETT, 1998). Diversos trabalhos demonstram que a PCR é mais sensível que o método convencional (BENNETT et al., 1998, LÖFSTROM, 2004; MYNT et al., 2006), e não é vulnerável a reações atípicas e não

depende de variações fenotípicas, evitando, assim, as interpretações falso-negativas na técnica microbiológica (HOORFAR et al. 1999).

A utilização de PCR na detecção direta de bactérias em alimentos é bastante descrita (AGARWAL et al., 2002; MYINT et al., 2006; CHEN et al., 2012) e sua introdução nesse contexto forneceu uma alternativa viável aos métodos convencionais de cultura (MALORNY et al., 2003a).

Ensaio de PCR e os métodos de cultura padrão na detecção de *Salmonella* em alimentos foram demonstrados como equivalentes (CROCI et al., 2004; LÖFSTRÖM et al., 2008). A PCR mostrou uma capacidade de detecção dessa bactéria em baixa concentração, após tempos de enriquecimento mais curtos do que outros ensaios (LEE et al., 2015). Porém, a maioria dos trabalhos que determinam sensibilidade e especificidade da PCR para detecção de *Salmonella* utilizam amostras artificialmente contaminadas (AABO et al., 1993; AGARWAL et al., 2002; WANG & YE, 2002; UYTENDAELE et al., 2003). As bactérias nessas condições diferem das naturalmente contaminadas, pois, essas últimas são expostas a diversas condições, como microbiota competidora e injúrias decorrentes de transporte, estocagem e processamento (D'AOUST et al., 1992).

Existem, porém, diversos estudos que mostram a melhor capacidade de detecção dos métodos convencionais de cultivos quando comparados à PCR em amostras de campo. Num estudo realizado por Gouvêa et al. (2012), tanto o método convencional quanto a PCR foram capazes de detectar *Salmonella* spp. em amostras contaminadas artificialmente, porém, nas amostras de campo somente pelo método convencional foi possível a detecção de *Salmonella* spp. Dessa mesma forma, Dickel (2005) comparando as técnicas de PCR e ELISA com o método convencional para detecção de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em carne de frango, obteve melhor resultado com a PCR, quando as amostras foram contaminadas artificialmente. Porém, quando testadas a campo, em três tipos de matadouros, o método convencional obteve melhor desempenho, seguido de ELISA e da PCR, com menor percentual de recuperação.

Nas amostras a campo, pode ocorrer número superior de bactérias competitivas comparadas a amostras artificialmente contaminadas. Além disso, pode ocorrer uma extração de DNA menos efetiva devido a agregamentos ou sequestro celulares. E, também, a presença de agente inibidores de PCR, como sais biliares,

bilirrubina, hemoglobina, ureia, polissacarídeos e fezes, podem comprometer os resultados (D'AOUST et al., 1992; LEE et al., 2015)

Outros estudos, porém, demonstram que a frequência de detecção de *Salmonella* spp. pela PCR é equiparada a frequência obtida pelo método convencional. Esta relação pode ser influenciada pelo uso de amostras pré-enriquecidas na PCR (OLIVEIRA et al., 2003; CROCI et al., 2004). Entretanto, quando se comparara o método convencional com a PCR a partir de amostras pré-enriquecidas e amostras enriquecidas, a PCR só tem resultados melhores do que a metodologia convencional quando realizada de amostras enriquecidas (OLIVEIRA et al., 2003; MYINT et al., 2006).

Conforme descrito por Lee et al. (2015), os limites de sensibilidade e de detecção dos métodos podem ser melhorados por técnicas de preparação de amostras e de purificação adicionais, como por exemplo, o pré-enriquecimento e enriquecimento da amostra. Esses autores descrevem que o enriquecimento usando água peptonada tamponada (APT) para os métodos baseados em PCR oferece uma alternativa rápida ao método de cultura padrão para a identificação de *Salmonella* spp. (LEE et al., 2015).

Porém, muitas desvantagens são pontuadas para utilização da PCR como rotina laboratorial: incapacidade em diferenciar células vivas e mortas, presença de inibidores da reação, complexidade do método, alto custo de investimento inicial, em equipamentos e reagentes, e a falta de legislação por parte dos órgãos oficiais que padronize e valide essa técnica (FARBER et al., 2001; MALORNY et al., 2003b; MARIN et al., 2006).

A IN 62 de 26 de agosto de 2003 do MAPA, que determina os métodos oficiais para análise microbiológica de alimentos de origem animal e água, refere que métodos moleculares podem ser utilizados para identificação de *Salmonella* spp., porém, não descreve esses métodos e indicam apenas quando os testes convencionais apresentarem resultados duvidosos (BRASIL, 2003). No Brasil, a IN 41, de 7 de junho de 2004 do MAPA oficializou um ensaio de PCR para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos como método alternativo (BRASIL, 2004).

Além da PCR, nos últimos anos, a validação e padronização de protocolos de PCR em tempo real (qPCR) têm sido relatados, a fim de facilitar a aplicação de

métodos mais rápidos para a detecção de patógenos de origem alimentar (DELIBATO et al., 2014).

A utilização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para a pesquisa de microrganismos em alimentos tem obtido muito sucesso na identificação rápida e de vários patógenos simultaneamente (CHEN et al., 2012). O uso de qPCR oferece vantagens, quando comparada com a bacteriologia clássica, em termos de acurácia, velocidade, limite de detecção, automatização e, algumas vezes, custo. Entretanto, da mesma forma que a PCR convencional, existem desafios associados com o uso da qPCR, como a detecção de baixos níveis de patógenos contaminantes, a baixa habilidade para diferenciar células mortas de viáveis e a ocorrência de componentes inibitórios da reação (IBRAHIM et al., 2014). Esses desafios podem ser superados utilizando caldos de enriquecimentos (CHEN et al., 2012).

A utilização de sequências características dos microrganismos alvos revela a alta especificidade desses testes. Os genes mais frequentemente utilizados para a detecção específica de *Salmonella* incluem: *invA* (gene da invasão proteica), *fimA* (gene que codifica a maior subunidade fimbrial), *spv* (gene da virulência), *stn* (gene da enterotoxina), *fliC* (gene da flagelina) e *hilA* (ativador transcricional do gene da invasão) (IBRAHIM et al., 2014).

Outro grande avanço na detecção de patógenos em alimentos pode ser o uso de estudos proteômicos para diagnóstico rápido, por meio da utilização da espectrometria de massa para caracterização de microrganismos. Esse método vem se tornando uma ferramenta importante para identificação bacteriana (FUJITA et al., 2005; TERAMOTO et al., 2007; ILINA et al., 2009; SCHULTHESS et al., 2016). A técnica de espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* - MS) com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* - MALDI) e analisador de massas do tipo tempo-de-voe (*Time of Flight* - TOF) permite a reprodutibilidade de espectros, podendo comparar o espectro de massas, obtido em poucos segundos, com os de referência de cepas conhecidas, podendo proporcionar a detecção do patógeno com mais rapidez do que os métodos convencionais (SIUZDAK, 2006).

A espectrometria pode ser outro método alternativo aos métodos convencionais. Nagy et al. (2009), trabalhando com espécies de *Bacterioides*, relataram que o poder de discriminação e identificação por MALDI-TOF MS foi

superior aos testes bioquímicos. Além disso, a identificação por MALDI-TOF apresenta resultados bastante semelhantes aos que se baseiam no sequenciamento de DNA (TERAMOTO et al., 2007).

Por ser um patógeno frequentemente associado a toxinfecções alimentares, a tipificação de *Salmonella* é uma ferramenta epidemiológica que permite a caracterização dos isolados, sendo capaz de agrupar as cepas com resultados idênticos (OLSEN et al., 1993; LIU et al., 2011). Isso é importante para se estabelecer a relação clonal entre os isolados, identificando, assim, a possível fonte do patógeno ao longo da cadeia produtiva e, permitindo o estabelecimento de medidas de controle e prevenção de doenças.

A sorotipagem analisa as expressões do genótipo em um determinado momento, porém, os marcadores fenotípicos podem não ser expressos de forma estável em qualquer condição (FARBER, 1996). Dessa forma, a aplicação de outras técnicas de tipificação torna-se fundamental para melhorar a diferenciação das cepas analisadas, como os métodos genotípicos, que minimizam as desvantagens da sorologia por meio da análise da genética microbiana.

Uma técnica bastante utilizada para a subtipificação é a eletroforese em campo pulsado, do inglês, *Pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE, que é baseada no genótipo do microrganismo, minimizando as desvantagens da sorologia. Diversos trabalhos que utilizaram PFGE em isolados de *Salmonella* demonstraram o alto poder discriminatório da técnica em detectar a diversidade das cepas (PERRON et al., 2007; XIA et al., 2009). Em um estudo realizado por Mürmann et al. (2008) com cepas de *Salmonella* de diferentes surtos alimentares, estes encontraram um único padrão no PFGE e demonstraram a relação clonal entre as cepas, auxiliando na elucidação da origem dos casos. As bactérias isoladas de um mesmo surto ou epidemia devem apresentar padrões idênticos na análise por PFGE, enquanto que as bactérias sem relação epidemiológica devem apresentar baixa similaridade de perfis gerados pela técnica (TENOVER et al., 1995).

1.6.2 Métodos de detecção de *Escherichia coli* verotoxigênica

Os métodos convencionais de detecção de *E. coli* verotoxigênica diferem da detecção de *E. coli* genérica, pois as cepas produtoras de verotoxinas não fermentam o sorbitol em ágar McConkey Sorbitol (SMAC) (ADAMS; MOSS, 2008).

Além disso, necessitam de enriquecimento inicial para alcançar uma concentração mínima para a detecção e o isolamento deve ser feito com meios seletivos. Da mesma forma que para a detecção de *Salmonella*, os métodos convencionais são bastante trabalhosos e demorados, levando de 5 a 7 dias para a obtenção dos resultados, uma vez que, após o isolamento de colônias típicas, deve ser realizado vários testes bioquímicos, além de sorológicos, para identificação e confirmação de *E. coli* verotoxigênica (SILVA et al., 2006). Além disso, essa metodologia está sujeita a ocorrência de falsos positivos, principalmente com *E. hermanni* que pode ser isolada de fezes e alimentos e também é sorbitol negativa em SMAC, podendo causar erros de interpretação (BORCZYK et al., 1987).

Uma alternativa para isso seria a adição de cefixime e telurito de potássio no SMAC (SMAC-CT), que auxiliaria a inibir parcialmente ou completamente o crescimento de outras cepas de *Escherichia* e todas ou muitas outras espécies de microrganismos sorbitol negativos, como *Proteus* (STROCKBINE et al., 1998; DUFFY et al., 2001). Entretanto, o SMAC-CT pode perder a sensibilidade de detecção de *E. coli* O157:H7 em condições de estresse bacteriano, como ocorre em alimentos, onde as células sofrem estresse sob a ação de calor, frio, acidez ou sal, e, apesar de estarem viáveis, são sensíveis ao cefixime e ao telurito (MENG; DOYLE, 1998; DUFFY et al., 2001).

Uma técnica bastante utilizada na etapa inicial de detecção de VTEC em amostras de alimentos é a Separação Imunomagnética (IMS), pois, reduz o tempo de análise e melhora a sensibilidade da detecção (WRIGHT et al., 1994; ISLAM et al., 2006; WANG et al., 2011). Essa técnica é descrita pela ISO 16654/2001 e consiste na formação de imunocomplexos por meio da utilização de partículas magnéticas revestidas com anticorpos que concentram as bactérias num volume menor e separadas da matriz, por meio da exposição a um campo magnético (ISO, 2001).

Métodos alternativos com o objetivo de melhorar a eficiência da detecção de patógenos em alimentos são constantemente desenvolvidos e validados, como o método baseado em ELISA, o Sistema VIDAS® (BioMérieux S.A.), que é um ensaio automatizado que detecta VTEC por meio de uma reação antígeno-anticorpo. Porém, para confirmar o resultado, deve ser realizado o isolamento da bactéria pelo método convencional (ZHU et al., 2011).

Métodos moleculares são também bastante utilizados para complementar as técnicas clássicas de isolamento bacteriano. A PCR na detecção de VTEC apresenta como vantagem a possibilidade de investigar simultaneamente vários genes e a possibilidade de detecção dos sorotipos virulentos, como a O157:H7. A utilização de sequências características dos microrganismos alvos revela a alta especificidade desse teste. Genes das toxinas *stx1* e *stx2*, *rfbE* (gene que codifica o antígeno somático do sorotipo O157), *hlyA* (gene que codifica o antígeno somático do sorotipo pO157), *eaeA* (gene da intimina), *uidA* (gene da β -glicuronidase) e *fliC* (gene que codifica o antígeno flagelar do sorotipo H7) são alguns dos exemplos de sequências usadas para detecção de *E. coli* O157:H7 (SON et al., 2014).

A utilização de PCR em tempo real também é descrita na detecção de VTEC em alimentos (FRATAMICO; DEBROY, 2010; CHEN et al., 2012; MISZCZYCHA et al., 2012), até mesmo com ensaios comercialmente disponíveis, como o Bax System® (DUPONT, 2012-13) e o GeneDiscPlates® (PALL, 2014), que detecta a presença de *E. coli* O157:H7 em 25g de amostra, em um tempo menor do que duas horas.

Entretanto, as desvantagens das técnicas de PCR e qPCR descritas na detecção de *Salmonella* também são válidas para *E. coli*, como a incapacidade de distinguir células viáveis e não viáveis (VERSALOVICK et al., 1994; MALORNY et al., 2003b), podendo ser estimado valores superiores de células vivas do que realmente existe na amostra (JUSTÉ et al., 2008) e presença de inibidores da reação, além da complexidade e do alto custo de implementação do método (FARBER et al., 2001; MALORNY et al., 2003b; MARIN et al., 2006). Ademais, existe a necessidade do enriquecimento da amostra com incubação prévia de, no mínimo, 18h no caso da *E. coli* O157:H7 (DUFFY et al., 2001).

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) em carcaças de bovinos durante o processamento em abatedouros-frigoríficos exportadores de Mato Grosso do Sul.

1.7.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* genérica e verotoxigênica em carcaças de bovinos, em três pontos diferentes do processo de abate (após esfolagem, após lavagem e após refrigeração), de três frigoríficos do Estado de Mato Grosso do Sul,
- padronizar PCR em tempo real para detecção de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) em carcaças bovinas,
- caracterizar genotipicamente as amostras bacterianas isoladas,
- introduzir a técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF para incrementar o método tradicional microbiológico na detecção de *Salmonella* spp. e *E. coli*,
- determinar o nível de contaminação por coliformes termotolerantes nos pontos amostrados, e
- verificar o perfil de sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

AABO, S.; RASMUSSEN, O. F.; ROSSEN, L.; SORENSEN, P. D. & OLSEN, J. E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, p. 171-178, 1993.

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. Janeiro a Dezembro de 2015. Disponível em <<http://www.abiec.com.br/download/relatorio-anual-2015.pdf>>. Acesso em 01 nov. 2016.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food Microbiology**. 3 ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008. 490 p.

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D.L.; SILVEIRA, W.D.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.3, p.297-306, 2007.

AGARWAL, A.; MAKKER, A.; GOEL, S. K. Application of the PCR technique for a rapid, specific and sensitive detection of *Salmonella* spp. in foods. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, n. 4, p. 243-25, 2002.

ALMEIDA, A. A. P. Garantia de qualidade em laticínios: uma abordagem atual. **Qualidade em Dia**, São Paulo, n. 18, jul./ago./set, 2001.

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

APHA - American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Chapter 25: *Salmonella*. 3.ed. Washington, p. 371-422, 1992.

BAGER, F.; PETERSEN, J. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 32, p. 473-481, 1991.

BENNETT, A. R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J. G.; BETTS, R. P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 437-441, 1998.

BOSILEVAC, J. M.; ARTHUR, T. M.; BONO, J. L.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; KALCHAYANAND, N.; KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in U.S. abattoirs that process fewer than 1000 head of cattle per day. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 6, p. 1272-8, 2009.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, v. 62, n. 3, p. 381- 390, 2002.

BORCZYK, A. A.; KARMALI, M. A.; LIOR, H.; DUNCAN, L. M. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet**, v. 329, n. 8524, p. 98. 1987.

BRASIL (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Teórico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasil, 10/01/2001, Seção 1, p. 46-53, 2001.

BRASIL (2003). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. **Métodos analíticos oficiais para**

análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, 18/09/2003, Seção 1, p.14, 2003.

BRASIL (2004) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 41 de 7 de junho de 2004. **Validação da metodologia utilizada pelo sistema de detecção patogênica para alimentos e amostras ambientais - A-BAX® para detecção de *Salmonella* spp em amostras de alimentos, água e amostras ambientais - swab como método alternativo equivalente ao método de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Diário Oficial da União, 15/06/2004, Seção 1, p. 3, 2004.

BRASIL (2005). Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Boletim Eletrônico Epidemiológico. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 - 2004**, ano 5, n. 6, 2005. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/15/Ano05-n06-ve-dta-brasil-completo.pdf>>. Acesso em 06 set. 2016.

BRASIL (2011). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*.** Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.60 p.

BRASIL (2015). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio - SRI. **Estatísticas de Comercio Exterior do Agronegócio Brasileiro – AGROSTAT. Resultados de 2015, Perspectivas para 2016.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/acs/apresentacao1.pdf>. Acesso em: 06 set. 2016.

BRASIL (2016a). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Animal: Exportação. 2016.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal>>. Acesso em: 06 set. 2016.

BRASIL (2016b). Secretária de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 06 set. 2016.

BRASIL (2016c). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Animal/Notícias: Começa venda de carne bovina in natura para os EUA**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2016/09/comeca-venda-de-carne-bovina-in-natura-para-os-eua>>. Acesso em: 08 nov. 2016.

BRICHTA-HARHAY, D. M.; ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; e GUERINI, M. N.; KALCHAYANAND, N.; KOOHMARAIE, M. Enumeration of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, cattle carcass, hide and faecal samples using direct plating methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p.1657-1668, 2007.

BROSETA, S.M.; BASTIAN, S.N.; ARNÉ, P.D.; CERF, O.; SANAA M. Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v. 203, n. 4, p. 347-361, 2001.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v.36, n.3, p.289-311, 2005.

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

CERQUEIRA, A.M.; GUTH, B.E.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.70, n.1/2, p.111-121, 1999.

CHANG, H-G, H.; TSERENPUNTSAG, B.; KACICA, M.; PERRY F. SMITH, P. F.; MORSE, D. L. Hemolytic Uremic Syndrome Incidence in New York. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, 2004.

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

CHEN, Y.; JACKSON, K. M.; CHEA, F. P.; SCHAFFNER, D. W. Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 72–80, 2001.

CHEN, J.; TANG, J.; LIU, Z.; CAI; BAI, X. Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 823–830, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – CAC. Joint FAO/WHO. Food Standards Programme. Codex Committee on Food Higiene. **Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessmente**. Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standarts Programme. Rome: FAO. CAC/GL 30, 1999.

COMMISSION REGULATION – EUROPEAN COMMISION N° 1441/2007 (ameding Regulation (EC) N° 2073/2005). **Microbiological criteria for foodstuffs**. Oficial Journal of the European Union, L322, p. 12 -29, 2007.

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

CROCI, L.; DELIBATO, E.; VOLPE, G.; DE MEDICI, D.; PALLESHI, G. Comparision of PCR, Eletrochemical Enzyme-linked Imunosorbent Assays, and the Standard

Culture method for detecting *Salmonella* in meat products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1393-1396, 2004.

D'AOUST J. Y.; SEWELL A. M.; WARBURTON D. W. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, 16:41–50, 1992.

D'AOUST, J. Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R., eds. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 3.ed. Washington: ASM Press, 2007. p.187–236.

DELIBATO, E.; SONNESSA, M.; DE MEDICI, D. European validation of Real-Time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in porkmeat, **International Journal of Food Microbiology**, 2014.

DICKEL, E.L.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; GIRARDELLO, R.; COLUSSI, F.M.; DUARTE, L.F.; PILOTTO, F.; NASCIMENTO, V.P. Microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella* em abatedouro de frango totalmente automatizado, semi-automatizado de grande porte e semi-automatizado de pequeno porte. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 133, p. 79-85, 2005.

DOMÍNGUEZ, A.; TORNER, N.; RUIZ, L.; MARTINEZ A.; BARTOLOME, R.; SULLEIRO, E.; TEIXIDO, A.; PLASENCIA, A. Foodborne *Salmonella*-caused outbreaks in Catalonia (Spain), 1990 to 2003. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 1, p. 209-213, 2007.

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

DUFFY, G.; GARVEY, P.; MCDOWELL, D. A. **Verocytotoxigenic *E. coli***. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull, Connecticut, USA, 2001.

DUPONT. **BAX® System Real-Time PCR Assay for *E. coli* O157:H7**. 2012-13. Disponível em: <http://www.dupont.com/content/dam/dupont/products-and-services/food-protection/food-protection-landing/documents/bax_rt-ecoli_proddesc.pdf>. Acesso: 07 set. 2016.

EFSA – European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. **The EFSA Journal**, v. 94, p. 3–288, 2006.

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

FARAH, S. M.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; IRINO, K.; DA SILVA, L. R.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B.; PIGATTO, C. P.; FADEL-PICHETH, C. M. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Parana State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 607-612, 2007.

FARBER, J. M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**, v. 59, p.1091-1101, 1996,

FARBER, J. M.; GENDEL, S. M.; TYLER, K. D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W. L.; FRITSCHER, S. C.; BARRETT, T. J. Molecular typing and differentiation, Chapter 11. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods**. 4th eds, pp. 127-156. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2001.

FDA - Food and Drug Administration. (2014). **Bacteriological Analytical Manual**, Chapter 5 *Salmonella*. Food and Drug Association, Washington, DC. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>>. Acesso em: 06 set. 2016.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 14, p. E173-E187, 2008.

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

FRATAMICO, P. M.; DEBROY, C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Food Using Real-Time Multiplex PCR Assays Targeting the *stx*₁, *stx*₂, *wzy*_{O157}, and the *fliC*_{H7} or *eae* Genes. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 4, p. 330-337, 2010.

FUJITA, Y.; NAKA, T.; DOI, T.; YANO, I. Direct molecular mass determination of trehalose monomycolate from 11 species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Microbiology**, v. 151, p. 1443–1452, 2005.

GALANIS, E.; LO FO WONG, D.M.; PATRICK, M. E.; BINSZTEIN, N.; CIESLIK, A.; CHALERMCHIKIT, T.; AIDARA-KANE, A.; ELLIS, A.; ANGULO, F. J.; WEGENER, H. C.; WORLD HEALTH ORGANIZATION GLOBAL SALM-SURV. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 381-388, 2006.

GEIMBA, M.P.; TONDO, E.C.; DE OLIVEIRA, F.A.; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1229-1233, 2004.

GERNER-SMIDT, P.; WHICHARD, J. M. Foodborne disease trends and reports. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, n.1, p.1-4, 2007.

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

GOUVÊA, R.; SANTOS, F. F.; ASCIMENTO, E. R. Isolamento bacteriológico e PCR na detecção de *Salmonella* spp. em peito de frango de estabelecimento varejista. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15; p. 1129, 2012.

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

GRIMONT, P. A. D., WEILL, F. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**. 9ed. Paris:Institut Pasteur, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 2007. 166p. Disponível em: <http://www.pasteur.fr/santé/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_2007.pdf> Acesso em: 05 mai. 2016.

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

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 13, p. E45-E62, 2007.

HASSAN, S. R. U.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 333-339, 2004.

HOLFINGER, C.; KARCH, H.; SCHMIDT, H. Structure and function of plasmid pCoID157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and its distribution among strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 24-29, 1998.

HOORFAR, J.; BAGGENSEN, D. L.; PORTING, P. H. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 35, p. 7-84, 1999.

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

IBRAHIM, W. A.; ABD EL-GHANY, W. A.; NASEF, S. A.; HATEM, M. E. A comparative study on the use of real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and standard isolation techniques for the detection of *Salmonellae* in broiler chicks. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, 2014.

ILINA, E. N.; BOROVSKEYA, A. D.; MALAKHOVA, M. M.; VERESHCHAGIN, V. A.; KUBANOVA, A. A.; KRUGLOV, A. N.; GOVORUN, V. M. Direct Bacterial Profiling by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Identification of Pathogenic *Neisseria*. **The Journal of Molecular Diagnostics: JMD**, v. 11, n. 1, p. 75–86, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579:2002: Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** Switzerland: International Organization for Standardization, 2002. 20p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 16654:2001: Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.** Geneva: International Organization for Standardization, 2001. 13p.

IRINO, K.; VAZ, T.M.; KATO, M.A.; NAVES, Z.V.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.; ROCHA, M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.; GUTH, B.E. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in Sao Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.4, p.446-447, 2002.

IRINO, K., KATO, M.A.M.F., VAZ, T.M.I., RAMOS, I.I., SOUZA, M.A.C., CRUZ, A.S., GOMES, T.A.T., VIEIRA, M.A.M., GUTH, B.E.C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 29-36, 2004.

ISLAM, M. A.; HEUVELINK, A. E.; TALUKDER, K. A.; ZWIETERING, M. H.; DE BOER, E. Evaluation of immunomagnetic separation and PCR for the detection of *Escherichia coli* O157 in animal feces and meats. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 12, p. 2865-9, 2006.

JAKABI, M.; BUZZO, A. A.; RISTORI, C. A.; TAVECHIO, A. T.; SAKUMA, H.; PAULA, A. M. R.; GELLI, D. S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994-1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.47-51, 1999.

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

JUSTÉ, A.; THOMMA, B. P. H. J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 745-61, 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.2, p.123-140, 2004.

KARMALI, M. A.; GANNON, V.; SARGEANT, J. M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, 2009.

KUBOTA, K.; IWASAKI, E.; INAGAKI, S.; NOKUBO, T.; SAKURAI, Y.; KOMATSU, M.; TOYOFUKU, H.; KASUGA, F.; ANGULO, F. J.; MORIKAWA, K. The human health burden of foodborne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyagi Prefecture, Japan. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.5, n.5, p.641-648, 2008.

KUSUMANINGRUM, H. D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W. C.; BEUMER, R. R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 227–236, 2003.

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

LE MINOR, L.; POPOFF, M. Y.. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 37, p. 465–468, 1987.

LEE, K. M., RUNYON, M., HERRMAN, T. J., PHILLIPS, R. & HSIEH, J. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264-276, 2015.

LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, B. E.; IRINO, K.; VETTORATO, M. P.; ONUMA, D. L.; DE CASTRO, A. F. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 97, n. 1/2, p.103-109, 2003.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **Journal of Infectious Diseases**, v. 155, p. 377-389, 1987.

LIU, W.; ZHU, X. N.; YU, S.; SHI, X. M. Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing. **Food Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1182-1189, 2011.

LO FO WONG, D. M. A.; HALD, T.; VAN DER WOLF, P. J.; SWANENBURG, M. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Production Science**, v. 76, n. 3, p. 215-222, 2002.

LÖFSTROM, C., AXELSSON, C. E. C. & RÅDSTRÖM, P. Validation of diagnostic PCR method for routine analysis of *Salmonella* spp. in animal feed samples. **Food Analysis Methods**, v.1, p. 23-27, 2008.

LÓPEZ, E. L., PRAD-JIMÉNEZ, V., ÓRYAN-GALLARDO, M., CONTRINI, M. M. *Shigella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing bloody diarrhea in Latin America. **Infections Disease Clinics of North America**, v. 14, p. 41-65, 2000.

MADDEN, R. H.; ESPIE, W. E.; MORAN, L.; MCBRIDE, J.; SCATES, P. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in Northern Ireland. **Meat Science**, v.58, n.4, p.343-346, 2001.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.6, p.1332-1344, 2005.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 290–296, 2003a.

MALORNY, B.; PANAYOTIS, T.T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**. v.83, n.1, p.39-48, 2003b.

MARIN, V. A.; LEMOS, A. A.; FREITAS, E. I. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.

MENG, J.; DOYLE, M. P. Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* 0157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 92-108.

MISZCZYCHA, S. D.; GANET, S.; DUNIERE, L.; ROZAND, C.; LOUKIADIS, E.; THEVENOT-SERGENTET, D. Novel real-time PCR method to detect *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk cheese and raw ground meat. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 8, p. 1373-81, 2012.

MORABITO, S., KARCH, H., KURKDJIAN, P.M., SCHMIDT, H., MINELLI, F., BIGEN, E., CAPRIOLI, A. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 840-842, 1998.

MOTSOELA, C.; COLLISON, E. K; GASHE, B. A. Prevalence of *Salmonella* in two Botswana abattoir environments. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 12, p. 1869-1872, 2002.

MÜRMAN, L.; DOS SANTOS, M. C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 191-195, 2009.

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

MYINT, M. S.; JOHNSON, Y. J.; TABLANTE, N. L.; HECKERT, R. A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, v. 23, p. 599-604, 2006.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.47-51, 2004.

NAGY, E., T. MAIER, E. URBAN, G. TERHES; M. KOSTRZEWA. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 796–802, 2009.

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

NORRUNG, B.; BUNCIC, S. Microbial safety of meat in the European Union. **Meat Science**, v. 78, n. 1, p. 14-24, 2008.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: A model for bacterial. **Annual Review Medical**, v. 52, p. 259-274, 2001.

OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; CÉ, M. C.; ROCHA, S. L. S.; CANAL, C. W. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 217-221, 2003.

OLSEN, J. E.; BROWN, D. J.; SKOV, M. N.; CHRISTENSEN, J. P. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis applications in investigations of salmonellosis among livestock. **Veterinary Quarterly**, v. 15, n. 4, p. 125-135, 1993.

PALL. Pall Corporation. **Rapid food pathogen detection using PCR technology: pathogenic *E. coli* O157, STEC, *Salmonella*, *Listeria*...** 2014. Disponível em: <<http://www.pall.com/main/food-and-beverage/product.page?id=20120614103141>>. Acesso em: 07 set. 2016.

PAPADOPOULOU, O. S.; CHORIANOPOULOS, N. G.; GKANA, E. N.; GROUTA, A. V.; KOUTSOUMANIS, K.P.; NYCHAS, G. J. Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. **Meat Science**, v. 90, p. 865–869, 2012.

PEREZ-RODRIGUEZ, F.; CASTRO, R.; POSADA-IZQUIERDO, G. D.; VALERO, A.; CARRASCO, E.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; ZURERA, G. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. **Meat Science**, v. 86, n. 479–485, 2010.

PERRON, G. G.; QUESSY, S.; LETELLIERG, A.; BELL, G. Genotypic diversity and antimicrobial resistance in asymptomatic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **Infections, Genetic and Evolution**, v. 7, p. 223–228, 2007.

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

PHILLIPS, D.; SUMMER, J.; ALEXANDER, J. F.; DUTTON, K. M. Microbiological quality of australian beef. **Journal of Food Protection**, v. 64. n. 5, p. 692-696, 2001.

PLYM-FORSHELL, L.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.25, n.2, p.541-554, 2006.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars**. 7 ed. Paris; Institut Pasteur, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 1997. 4p.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. The genus *Salmonella*, In BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J.T., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: Springer, 2005. v.2, p.764-799.

RALL, V. L. M.; RALL, R.; ARAGON, L. C.; SILVA, M. G. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, n.2, p.147-150, 2005.

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

RIGOBELLO, E. C.; SANTO, E.; MARIN, J. M. Beef carcass contamination by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in an abattoir in Brazil: characterization and resistance to antimicrobial drugs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 6, p. 811-816, 2008.

RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; ROLDÁN, C. D.; BALBI, L.; GARCÍA, B.; FIORILLI, G.; SOSA-ESTANI, S.; KINCAID, J.; RANGEL, J.; GRIFFIN, P. M. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.1, p.88-96, 2006.

RIVAS, M.; ESTANI, S. S.; RANGEL, J.; CALETTI, M. G.; VALLÉS, P.; ROLDÁN, C. D.; BALBI, L.; MOLLAR, M. C. M.; AMOEDO, D.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; HOEKSTRA, R. M.; MEAD, P.; GRIFFIN, P. M. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, 763, 2008.

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

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, n.5, p.1753-1754, 2000.

SAITOH, T.; IYODA, S.; YAMAMOTO, S.; LU, Y.; SHIMUTA, K.; OHNISHI, M.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H. Transcription of the *ehx* Enterohemolysin gene is positively regulated by *GrlA*, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.14, p.4822-4830, 2008.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1994. 418p.

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

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

SCHULTHESS, B.; BLOEMBERG, G. V.; ZBINDEN, A.; MOUTTET, F.; ZBINDEN, R.; BÖTTGER, E. C.; HOMBACH M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Fastidious Gram-Negative Rods. **Journal of Clinical Microbiology**, Mar, v. 54, n. 3, p. 543-8, 2016.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food and beverage-associated microorganisms: a review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 1, p. 1-22, 2007.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 352-9, 2006.

SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; CONTRERAS, C; BERAQUET, N. J.; YOKOYA, F; NASCIMENTO, C. A.; OLIVEIRA, V. M.; TSE, C. L. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 223-227, 2001.

SIUZDAK, G. **The expanding role of mass spectrometry in biotechnology**. 2.ed. San Diego: MCC Press, 2006. 257p.

SON, I.; BINET, R.; MAOUNOUNEN-LAASRI, A.; LIN, A.; HAMMACK, T. S.; KASE, J. A. Detection of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes with multiplex PCR. **Food Microbiology**, v. 40, p. 31-40, 2014.

SORENSEN, O; VAN DONKERSGOED, J.; MCFALL, M.; MANNINEN, K.; GENSLER, G.; OLLIS, G. *Salmonella* spp. Shedding by Alberta beef cattle and the detection of *Salmonella* spp. in ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 3, p. 484-491, 2002.

STEPHAN, R., SCHUMACHER, S. Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. **Letters in Applied Microbiology**, **32**: 114-117, 2001.

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

STROCKBINE, N. A.; WELLS, J. G.; BOPP, C. A.; BARRET, T. J. Overview of detection and subtyping methods. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* 0157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 331-356.

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

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 5, p. 315-322, 1996.

TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C.; PERESI, J. T.; FUZIHARA, T. O.; YONAMINE, E. K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S. A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 1041-1044, 2002.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–2239, 1995.

TERAMOTO, K.; SATO, H.; SUN, L.; TORIMURA, M.; TAO, H.; YOSHIKAWA, H.; HOTTA, Y.; HOSODA, A.; TAMURA, H. Phylogenetic classification of *Pseudomonas putida* strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. **Analytical Chemistry**, v. 15, n. 79, p. 8712-9, 2007.

TIMM, C. D.; IRINO, K.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. M.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; MOREIRA, C. N.; ALEIXO, J. A. Virulence markers and serotypes of Shiga toxinproducing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Letter in Applied Microbiology**, v.44, n.4, p.419-425, 2007.

UYTTENDAELE, M.; VANWILDEMEERSCH, K.; DEBEVERE, J. Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p.386–391, 2003.

VAN ASTEN, A. J.; VAN DIJK, J. E. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.44, n.3, p.251-259, 2005.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.1139-1145, 2006.

VARNAM, A. H. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. Aylesbury: Wolfe, 1991. p.51-462.

VERSALOVICK, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUJIN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

WANG, H.; LI, Y.; WANG, A.; SLAVIK, M. Rapid, sensitive, and simultaneous detection of three foodborne pathogens using magnetic nanobead-based

immunoseparation and quantum dot-based multiplex immunoassay. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 12, p.2039-47, 2011.

WANG, S. J.; YEH, D. B. Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella* Enteritidis in foods and fecal samples. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p.422–427, 2002.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug-resistant *Salmonella*. Food Safety Department.** Fact sheet n. 139, 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 06 set. 2016.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness.** Fact sheet n. 237, 2007. Disponível em: <https://foodhygiene2010.files.wordpress.com/2010/06/who-food_safety_fact-sheet.pdf>. Acesso em: 06 set. 2016.

WRIGHT, D. J.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. **Epidemiology & Infection**, v. 113, n. 1, p. 31-9, 1994.

XIA, X.; ZHAO, S.; SMITH, A.; MCEVOY, J.; MENG, J.; BHAGWA, A. A. Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 93–98, 2009.

ZHU, P.; SHELTON, D. R.; LI, S.; ADAMS, D. L.; KARNS, J. S.; AMSTUTZ, P.; TANG, C. M. Detection of *E. coli* O157:H7 by immunomagnetic separation coupled with fluorescence immunoassay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 30, n. 1, p. 337-41, 2011.

ARTIGO 1

***Salmonella* spp. em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouros-frigoríficos exportadores**

Artigo submetido:

Meat Science

1 ***Salmonella* spp. em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouros-**
2 **frigoríficos exportadores**

3

4 Daniele Bier^{a,b}, Newton Valério Verbisck^c, Jalusa Deon Kich^d, Sabrina Castilho Duarte^d, Márcio
5 Roberto Silva^e, Luiza Mendes Valsoni^a, Carlos Alberto do Nascimento Ramos^a, Dália dos Prazeres
6 Rodrigues^f, Flávio Ribeiro de Araújo^{e,*}

7

8 ^a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av.
9 Senador Felinto Muller, 2443, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

10 ^b Universidade Católica Dom Bosco, Av. Tamandaré, 6000, 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil.

11 ^c Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia nº 830, Zona Rural, 79106-550, Campo Grande, MS,
12 Brasil.

13 ^d Embrapa Suínos e Aves, Rodovia BR-153, Km 110, Distrito de Tamanduá, 89715-899, Concórdia,
14 SC, Brasil.

15 ^e Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco, 36038-330, Juiz de Fora,
16 MG, Brasil.

17 ^f Laboratório de Enterobactérias, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, 21040-900,
18 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

19 *Corresponding author: flabio.araujo@embrapa.br

20

21 **RESUMO**

22 O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de *Salmonella* spp. em amostras
23 coletadas de carcaças de bovinos, em três pontos da linha de abate (após a esfolagem, lavagem e
24 refrigeração) de três frigoríficos exportadores no Brasil. A detecção foi realizada pela ISO
25 6579:2002, e confirmada por PCR e qPCR. Os isolados foram tipificados por testes de
26 sorologia e PFGE e avaliado o perfil de sensibilidade aos antibióticos pelo método de
27 difusão em disco. A contaminação foi detectada em apenas um abatedouro-frigorífico. As
28 contaminações das carcaças (n = 90) e amostras de carne (n = 270) por *Salmonella* spp. foram
29 6 (6,7%) e 7 (2,6%), respectivamente. Todos os isolados foram confirmados por PCR e qPCR.
30 A sorologia identificou 3 sorotipos diferentes: Heidelberg, GIVE e Typhimurium. No entanto,
31 PFGE mostrou um único perfil: Typhimurium. As cepas apresentaram 100% de sensibilidade
32 à ampicilina e tetraciclina. As carcaças positivas após a refrigeração apresentam um risco
33 direto para o consumidor, uma vez que, após este processo, a carne está pronta para ser
34 comercializada.

35 **Palavras-chave:** Sorotipo; Resistência a antibióticos; Salmonelose; Indústria de carne bovina;
36 Esfola; Resfriamento

37

38 **1. Introdução**

39

40 A carne bovina é um dos alimentos mais importantes da dieta da população e possui
41 alto impacto na economia do Brasil. Atualmente, o país é o maior exportador de carne bovina
42 do mundo e está nessa liderança desde 2008. Em 2015, o volume de exportação alcançou 1,4
43 milhão de toneladas e receita bruta na ordem de US\$ 5,9 bilhões, valores que representam uma
44 participação de 28% do comércio internacional, exportando para mais de 170 países em
45 diversas regiões do mundo como América Latina, Oriente Médio, Rússia, União Europeia e
46 África (ABIEC, 2016).

47 O Estado de Mato Grosso do Sul tem o quarto maior rebanho de bovinos do País e está
48 em segundo lugar no número de bovinos abatidos, com um abate anual de 3,9 milhões e um
49 peso acumulado das carcaças de 849 mil toneladas. No cenário das exportações de carne do
50 país, o Estado representa 9,4% do total da carne bovina brasileira, exportando principalmente
51 para Hong Kong, China, Egito, Rússia, Irã, Venezuela, Chile, Itália, Vietnã e Holanda (Brasil,
52 2016).

53 Apesar de ser um dos itens mais importantes da dieta alimentar da população e
54 apresentar um dos maiores potenciais de crescimento, a carne e seus derivados são
55 considerados um dos principais responsáveis pela veiculação de patógenos aos seres humanos
56 (Rhoades, Duffy & Koutsoumanis, 2009), ocasionando as chamadas doenças transmitidas por
57 alimentos (DTAs).

58 A contaminação microbiológica das carcaças bovinas ocorre, principalmente, durante
59 o processamento e manipulação, como esfola, evisceração, cortes, embalagem, estocagem e
60 distribuição (Borch & Arinder, 2002; Jay, 2000; Madden, Murray & Gilmour, 2004). A
61 contaminação cruzada de bactérias patogênicas, por meio de utensílios utilizados na
62 manipulação dos alimentos, é reconhecida como importante veículo de contaminação ao
63 longo do processamento da carne e fator importante para o desenvolvimento das doenças de
64 origem alimentar (Papadopoulou et al., 2012; Perez-Rodriguez et al., 2010).

65 Segundo a Organização Mundial da Saúde, *Salmonella* sp. é um dos microrganismos
66 patogênicos de maior relevância na carne bovina, sendo sua presença indicativa de risco ao
67 consumidor (WHO, 2005). De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos

68 Alimentos, *Salmonella* ser. Typhimurium foi o sorovar mais frequentemente associado ao
69 consumo de carne de aves, suínos e bovinos contaminados (EFSA, 2006).

70 O mercado importador estabelece diferentes padrões de qualidade e higiene que
71 devem ser atingidos pelos países produtores. De maneira geral, a carne destinada ao mercado
72 externo deve ser analisada quanto à presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos,
73 podendo ocorrer limitação à comercialização desses produtos quando não atingidos os
74 critérios microbiológicos estabelecidos pelos países importadores. O Sistema de Alerta
75 Rápido para Alimentos da União Europeia (*Rapid Alert System for Food and Feed - RASFF*)
76 foi criado para regulamentação da alimentação humana e animal, e, nos casos em que for
77 identificado um risco para a saúde humana, são estabelecidas as medidas necessárias, tais
78 como retenção na fonte, notificação de informação, apreensão ou rejeição desses produtos
79 perigosos. Por meio desse sistema de alerta, autoridades sanitárias na União Europeia (UE)
80 vêm retendo cargas de carnes do Brasil, Argentina, Austrália e Estados Unidos, como
81 resultado da rigidez no controle de patógenos, como *Salmonella*, e ampliando as incertezas
82 entre exportadores e importadores. Somente de maio de 2014 a maio de 2016, duas cargas de
83 carne bovina brasileira foram retidas e notificadas pela presença de *Salmonella* spp. (RASFF,
84 2016).

85 Os Estados Unidos exigem a realização diária de testes microbiológicos para pesquisa
86 de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., enquanto a União Europeia exige a enumeração de
87 microrganismos mesófilos aeróbios e enterobactérias, além da pesquisa de *Salmonella* spp.
88 (Commission Regulation – EU, 2007). No Brasil, segundo os padrões microbiológicos atuais
89 da ANVISA, a exigência é apenas para carnes resfriadas, ou congeladas, *in natura*, de
90 bovinos (carcaça inteiras ou fracionadas, quartos ou cortes), devendo apresentar ausência de
91 *Salmonella* spp. (Brasil, 2001), não sendo exigido à enumeração de microrganismos
92 indicadores de higiene, como *E. coli*.

93 O aumento de cepas de *Salmonella* multirresistentes, isoladas a partir de seres
94 humanos, tem sido associado com a utilização generalizada de agentes antimicrobianos na
95 produção de alimentos para animais. A propagação da resistência antimicrobiana através da
96 cadeia alimentar é considerada um importante problema de saúde pública (Raufu et al., 2014).
97 Assim, a análise da susceptibilidade antimicrobiana é fundamental no contexto clínico e
98 epidemiológico (Silley, 2012).

99 Nesse sentido, para produção e exportação de produtos cárneos de qualidade, é
100 fundamental o desenvolvimento de estudos quantitativos e qualitativos relacionados à
101 segurança microbiológica. A identificação da presença de microrganismos potencialmente

102 patogênicos, como *Salmonella*, nas carcaças de bovinos durante as operações de abate,
103 contribuem de forma significativa com a implantação de programas de monitoramento da
104 qualidade e de medidas preventivas e conseqüentemente, com a redução de riscos à saúde do
105 consumidor.

106 O objetivo deste trabalho foi investigar, em diferentes pontos do processo de abate, a
107 presença de *Salmonella* spp. em carcaças bovinas em abatedouros-frigoríficos exportadores de
108 Mato Grosso do Sul, por meio de diferentes técnicas de diagnóstico, e avaliar o perfil de
109 sensibilidade das cepas isoladas frente aos antimicrobianos.

110

111 **2. Material e Métodos**

112

113 Foram coletadas amostras de carcaças de bovinos em três abatedouros-frigoríficos
114 exportadores, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, que funcionam sob Inspeção Federal.

115 Em cada estabelecimento foram amostradas cinco carcaças por semana durante seis
116 semanas consecutivas, conforme estabelecido pela União Europeia para testes
117 microbiológicos em carcaças (*Commission Regulation* – EU, 2007) e previstos na Circular
118 n°463 da Divisão de Controle do Comercio Internacional – DCI, do Departamento de
119 Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, que estabelece os programas de
120 autocontroles de estabelecimento habilitados para os Estados Unidos (EUA) e para Estados-
121 Membros da União Europeia (UE) (Brasil, 2004). As carcaças amostradas eram de bovinos da
122 raça Nelore, sem distinção de sexo e idade, oriundos de diversos lotes de diferentes
123 propriedades de Mato Grosso do Sul.

124 Foram coletadas, pelo método não destrutivo, amostras da carcaça de um mesmo
125 animal, e mesma meia carcaça, em três pontos diferentes da linha de abate: após a esfolagem, logo
126 após a lavagem e após a refrigeração de aproximadamente 24 horas. Para a coleta das
127 amostras foram utilizadas esponjas de 11,5 x 23,0 cm desidratadas e esterilizadas (Speci-
128 Sponge® - Nasco, EUA) acondicionadas individualmente em sacos plásticos estéreis (Whirl
129 Pak® - Nasco, EUA). As esponjas foram hidratadas com 10 mL de Água Peptonada
130 Tamponada 1% (APT 1%) e friccionadas com o auxílio de luvas em uma área de 100 cm² no
131 peito do animal, 100 cm² no vazio e 200 cm² na região próxima ao lagarto, na alcatra (onde é
132 realizado o procedimento de oclusão do reto durante o abate) utilizando o mesmo molde e a
133 mesma esponja, tomando o cuidado de fazer a colheita dos pontos de menor contaminação
134 seguido pelos pontos de maior contaminação, teoricamente, nessa ordem: vazio, peito e
135 alcatra. Os pontos de amostragem selecionados são aqueles descritos nos regulamentos da

136 Comissão Europeia (*Commission Regulation* – EU, 2007) como as áreas mais susceptíveis à
137 contaminação durante o abate, devendo a área total cobrir no mínimo 400 cm². A coleta foi
138 realizada utilizando um molde de aço inox esterilizado, com 10 x 10 cm, abrangendo pelo
139 menos 100 cm² por ponto de amostragem, totalizando 400 cm² de superfície amostrada. Este
140 procedimento foi adotado para a coleta dos três pontos amostrados. As esponjas foram
141 transferidas para a bolsa plástica, e transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas
142 contendo gelo reciclável.

143 Cepas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CRMVS,
144 FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, foram utilizadas como controles negativos e positivos
145 para todas as técnicas: *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), *Citrobacter freundii*
146 INCQS 00576 (ATCC 43864), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis INCQS
147 00258 (ATCC 13076) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium INCQS
148 00150 (ATCC 14028).

149

150 2.1 Isolamento bacteriano

151

152 A cada bolsa plástica contendo as esponjas foram adicionados 200 mL de APT 1%, e a
153 mistura homogeneizada em *stomacher* por 60 segundos e colocadas em frascos de
154 Erlenmeyer, sendo esta a amostra inicial. Esses frascos foram incubados a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por $18 \pm$
155 2 h.

156 Para detecção de *Salmonella* spp., foi utilizada a metodologia descrita no *International*
157 *Organization for Standardization* (ISO 6579:2002) com modificações. Após as etapas de
158 enriquecimento, seleção e diferenciação, conforme estabelecido pela ISO 6579, as colônias
159 suspeitas isoladas dos meios de cultivos padrão foram submetidas às provas bioquímicas
160 complementares, compostas pelas provas de indol, ureia, motilidade, descarboxilação de
161 lisina, produção de H₂S, vermelho de metila, Voges-Proskauer, fermentação de carboidratos
162 (*Triple Sugar Iron*), citrato e β -galactosidase.

163

164 2.2 Extração de DNA

165

166 A extração do DNA bacteriano, para as técnicas de PCR e qPCR, foi realizada
167 utilizando o *kit* comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA),
168 seguindo as instruções do fabricante. As amostras submetidas à extração foram as colônias
169 que estavam em ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e/ou Ágar de desoxicolato-lisina-xilose (XLD)

170 e em caldo trípico de soja (TSB). Os isolados das seguintes amostras foram submetidos à
171 extração de DNA:

- 172 • Isolados com características bioquímicas positivas para *Salmonella* spp.
- 173 • Isolados com identificação bioquímica inconclusiva para *Salmonella* spp.
174 (resultados duvidosos no teste de β -galactosidase)
- 175 • Isolados aleatórios (n=85) selecionadas de um total de 259 amostras
176 bioquimicamente incompatíveis para *Salmonella* spp.

177

178 2.3 PCR Convencional

179

180 A PCR convencional para confirmação de *Salmonella* spp. foi realizada segundo
181 Myint, Johnson, Tablante & Heckert (2006), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para
182 verificar a presença do gene *invA* (Skyberg, Logue & Kolan, 2006).

183 Os produtos da amplificação foram corados com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA,
184 EUA), separados em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato EDTA – pH 8,2 (TAE 1x)
185 e realizada a eletroforese. Após, a imagem foi registrada em um fotodocumentador L-PIX
186 Image EX (Loccus Biotecnologia - Loccus do Brasil, Cotia, SP, Brasil).

187

188 2.4 PCR tempo real

189

190 Para a qPCR, iniciadores e sondas de DNA para sistema TaqMan MGB foram
191 desenhados com o programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a
192 detecção de DNA foi realizada em aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City,
193 CA, EUA). Os *primers* e sonda desenhados para o sistema TaqMan MGB para pesquisa do
194 gene de virulência *InvA* foram: *forward* 5'GCGAGCAGCCGCTCAGT3', *reverse*
195 5'CGAGATCGCCAATCAGTCCTA3' e *probe* NEDTGAGGAAAAGAAGGGTC
196 GTMGBNFQ. O tamanho do fragmento amplificado é de 63pb.

197

198 2.5 Sorotipificação

199

200 Os isolados de *Salmonella* spp. confirmados pela PCR e qPCR foram enviados ao
201 Laboratório de Enterobactérias do Centro de Referência Nacional de Cólera e outras
202 Enteroinfecções Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro – RJ,

203 para sorotipificação de acordo com o esquema Kauffmann–White usando os antisoros O
204 (contra antígenos somáticos) e H (contra antígenos flagelares).

205

206 2.6 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

207

208 Os isolados de *Salmonella* spp. identificados pelos métodos bioquímicos, PCR e qPCR
209 foram analisados por PFGE (Ribot et al., 2006), seguindo os procedimentos do protocolo
210 *PulseNet* (Centros de Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA;
211 <http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm>). No mínimo dois isolados de cada amostra foram
212 submetidos à digestão pela *XbaI* e *BlnI* (Thermo Scientific Fermentas, Leicestershire, Reino
213 Unido). A eletroforese foi realizada em um gel de agarose a 1% utilizando 0,5x tampão Tris-
214 borato-EDTA (TBE) em um sistema CHEF DR-II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a 6
215 V/cm durante 19 horas a 14 °C, com um pulso inicial de 2 min e 16 s e pulso final de 63,8 s.
216 *Salmonella* Braenderup (ATCC BAA-664) foi utilizada como cepa de referência. Depois da
217 PFGE, o gel foi corado com brometo de etídio (2 mg/mL; Sigma, St. Louis, MO) e
218 fotografados num transiluminador UV, e a imagem foi digitalmente processada em um
219 sistema Kodak 2200 (Kodak, Rochester, Nova Iorque) e os perfis eletroforéticos (pulsotipos)
220 foram analisados utilizando-se o software Bionumerics (Applied Maths BVBA, Saint-
221 Martens-Latem, Bélgica). Uma tolerância de posição migração da banda de 1,7% foi usada
222 para a análise dos padrões do PFGE (Carriço et al., 2005). Os isolados com pelo menos uma
223 diferença de banda foram considerados de pulsotipos distintos. Os dendrogramas foram
224 construídos com o método de agrupamento pelas médias aritméticas não ponderadas
225 (UPGMA) e o coeficiente de similaridade Dice (Hunter; Gaston, 1988).

226

227 2.7 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana

228

229 O perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. isoladas foi
230 determinado de acordo com *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), por
231 meio da técnica de disco-difusão (CLSI, 2011), empregando-se os antimicrobianos:
232 ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem e tetraciclina, de acordo com a
233 a indicação da *United States Food and Drug Administration* (U.S. FDA) para membros da
234 família Enterobacteriaceae (FDA, 2009).

235

236

237 2.8 Análises estatísticas

238

239 Os números de amostras positivas apresentadas em cada período de avaliação, após a
 240 esfola, após a lavagem e após o resfriamento, foram comparados entre si com o software
 241 OpenEpi (Dean, Sullivan & Soe, 2013). Para avaliar se existe alguma associação entre cada
 242 dois períodos de avaliação e a presença ou ausência de *Salmonella*, foi utilizado o teste Exato
 243 de Fisher com método mid-P para amostras pareadas.

244

245 **3. Resultados**

246

247 Das 90 amostras, provenientes de 30 carcaças analisadas no frigorífico I, sete amostras
 248 (7,7%) de seis carcaças foram bioquimicamente compatíveis com *Salmonella* spp., sendo três
 249 carcaças positivas após a refrigeração, uma após a esfola, uma após a lavagem, e uma carcaça
 250 apresentou duas amostras positivas (após a esfola e após a refrigeração). Todas as carcaças
 251 analisadas nos abatedouros-frigoríficos II e III foram negativas para *Salmonella* spp. (Tabela
 252 1).

253

254 **Tabela 1**

255 Amostras de carcaças bovinas contaminadas com *Salmonella* encontradas após a esfola,
 256 lavagem e refrigeração, em três abatedouros-frigoríficos destinados à exportação, Mato
 257 Grosso do Sul, Brasil.

Origem	Número de carcaças	Carcaças Positivas	Amostras positivas após a esfola (%)	Amostras positivas após a lavagem (%)	Amostras positivas após a refrigeração (%)
Abatedouro-Frigorífico I	30	6 (20%)	2 (6,6%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)
Abatedouro-Frigorífico II	30	0% (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Abatedouro-Frigorífico III	30	0% (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	90	6 (6,7%)	2 (2,2%)	1 (1,1%)	4 (4,4%)

258

259 O teste Exato de Fisher com método mid-P para amostras pareadas não encontrou
 260 significância estatística ($p \geq 0,05$) entre cada dois períodos de avaliação e a presença ou
 261 ausência de *Salmonella* spp.. No entanto, foi observada uma tendência de aumento das

262 diferenças de positividade para as comparações após a esfola/após a lavagem, após a
 263 esfola/após o resfriamento, após a lavagem/ após o resfriamento, a qual foi evidenciada pela
 264 redução dos valores de P, respectivamente (Tabela 2).

265

266 **Tabela 2**

267 Comparação dos períodos de processamento do abate e a presença ou ausência de *Salmonella*
 268 usando amostras pareadas das mesmas carcaças.

Comparações pareadas		Valor de P do teste Exato de Fisher com método mid-P	
Par 1 (% de positivas)	Par 2 (% de positivas)	1-cauda	2-caudas
Após esfola (2,2)	Após lavagem (1,1)	0,3125	0,6250
Após esfola (2,2)	Após refrigeração (4,4)	0,1875	0,3750
Após lavagem (1,1)	Após refrigeração (4,4)	0,1094	0,2188

269

270 Das 270 amostras coletadas nos três abatedouros, sete isolados com características
 271 bioquímicas compatíveis, quatro inconclusivas e 85 bioquimicamente incompatíveis com
 272 *Salmonella* foram testadas pelas técnicas de PCR convencional e qPCR.

273 Os quatro isolados que apresentaram resultados inconclusivos e as 85 cepas negativas
 274 nos testes bioquímicos também foram negativas nas técnicas de PCR e qPCR.

275 As sete amostras bioquimicamente positivas para *Salmonella* spp. foram também
 276 confirmadas por PCR e qPCR, e mostraram três diferentes perfis após a sorotipificação.

277 As carcaças positivas, os pontos de contaminação e os sorotipos de *Salmonella* spp.
 278 são apresentados na Tabela 3.

279

280

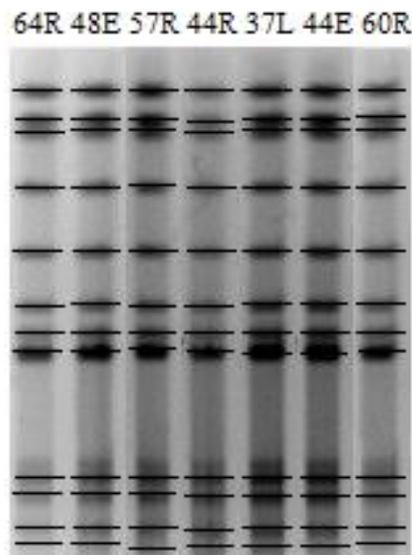
281 **Tabela 3**

282 Sorotipagem das 7 amostras de *Salmonella* isolados de 270 amostras de carcaças bovinas em
 283 três pontos diferentes da linha de abate do abatedouro-frigorífico I, destinado à exportação,
 284 Mato Grosso do Sul, Brasil.

Amostra	Esfola	Lavagem	Refrigeração	Sorotipagem
Carçaça 37	Negativo	Positiva	Negativo	Typhimurium
Carçaça 44	Positiva	Negativo	Positiva	Typhimurium
Carçaça 48	Positiva	Negativo	Negativo	Heidelberg
Carçaça 57	Negativo	Negativo	Positiva	Give
Carçaça 60	Negativo	Negativo	Positiva	Typhimurium
Carçaça 64	Negativo	Negativo	Positiva	Typhimurium

285

286 Em relação aos perfis gerados por PFGE para as sete amostras de *Salmonella*, houve
 287 100% de similaridade entre as amostras (Figura 1).



288

289 Figura 1. Perfil de macrorrestricção do DNA genômico por PFGE de amostras de *Salmonella*
 290 spp., isoladas de 90 carcaças de bovinos no abatedouro-frigorífico I, destinado à exportação,
 291 Mato Grosso do Sul, Brasil.

292 *E -Esfola, L- Lavagem, R-Refrigeração.

293

294 Em relação ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, as cepas de *Salmonella* spp.
 295 isoladas das carcaças dos bovinos apresentaram sensibilidade de 100% a gentamicina, a

296 ampicilina, a ciprofloxacina e a tetraciclina, 71,4% a cefotaxima e 28,6% a imipenem (Tabela
297 4).

298

299 **Tabela 4**

300 Perfil de sensibilidade da *Salmonella* aos antimicrobianos das amostras isoladas de carcaças
301 de bovinos no abatedouro-frigorífico I, destinado à exportação, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Amostras*	Ampicilina	Gentamicina	Imipenem	Ciprofloxacina	Cefotaxima	Tetraciclina
37L	S	S	I	S	R	S
44E	S	S	R	S	S	S
44R	S	S	R	S	S	S
48E	S	S	I	S	R	S
57R	S	S	S	S	S	S
60R	S	S	I	S	S	S
64R	S	S	S	S	S	S
<i>S. Typhimurium</i>	S	S	I	S	R	S

302 S- sensível I- intermediário R- resistente.

303 **S. Typhimurium* INCQS 00150 (ATCC 14028); E -Esfola, L- Lavagem, R-Refrigeração.

304

305

306 **4. Discussão**

307

308 O presente estudo recuperou sete isolados de *Salmonella* spp. das carcaças bovina
309 avaliadas. Dois isolados (2,2%) foram encontrados após a esfolagem do animal, sendo esta etapa
310 considerada um ponto crítico do abate, devido à possibilidade de contaminação da superfície
311 da carcaça com microrganismo presentes na pele, pelos e cascos dos animais (Lambert, Smith
312 & Dodds, 1991; Penney et al., 2007). Após o processo de lavagem, apenas uma carcaça
313 apresentou isolamento de *Salmonella* spp., o que corrobora com a finalidade desse
314 procedimento, que serve para reduzir a carga microbiana superficial da carcaça (Dickson,
315 1988). Entretanto, nos resultados encontrados no presente trabalho, o maior isolamento de
316 *Salmonella* spp., ocorreu após a refrigeração, o que pode ter ocorrido devido à contaminação
317 durante a manipulação dessas carcaças para dentro da câmara de resfriamento. As baixas
318 temperaturas reduzem o número de microrganismos, mas não provocam a destruição
319 completa (Michener & Elliott, 1964). Essa contaminação pode ter ocorrido indiretamente, por
320 meio de utensílios utilizados no abate, roupas dos operários (Podpečan, Pengov & Vadnjaj,
321 2007; Pordesimo, Wilkerson, Womac & Cutter, 2002; Prasai et al., 1995; Rahkio & Korkeala,

322 1996) e, principalmente as mãos dos manipuladores, que apresentam ampla distribuição de
323 microrganismos (Bell, 1997; Gill & McGinnis, 2003). Além disso, os pisos podem ser uma
324 importante fonte de contaminação, por meio da transferência de contaminação para os sapatos
325 dos trabalhadores ou por meio da limpeza com água sob alta pressão, podendo espalhar
326 microrganismos em suspensão no ar, por meio das gotículas de água (Barros, Nero, Monteiro
327 & Beloti, 2007).

328 Essas carcaças com presença de *Salmonella* após a refrigeração implicam diretamente
329 em risco ao consumidor, uma vez que, após esse processo, a carne está pronta para ser
330 comercializada. Uma elevada porcentagem de doenças transmitidas por alimentos é causada
331 por falha dos consumidores no preparo desses de forma higiênica. Uma prática bastante
332 comum no preparo doméstico é usar o mesmo equipamento de cozinha, tanto para carne crua
333 como para saladas cruas e frutas. Tal prática pode levar à contaminação cruzada com
334 microrganismos patogênicos presentes na carne crua para frutas e legumes, que são
335 consumidos, principalmente, sem nenhum processamento ou cozimento. Além disso, a
336 lavagem ou a desinfecção dos equipamentos de cozinha pode não ser suficiente para evitar a
337 contaminação cruzada com *S. Typhimurium* para os alimentos prontos para serem
338 consumidos (Gkana, Lianou & Nychas, 2016).

339 Nesse estudo, das sete cepas sorotipadas, cinco foram classificadas como
340 Typhimurium, uma como Give e uma como Heidelberg. Entretanto, quando submetidas à
341 técnica de PFGE, as sete amostras de *Salmonella* apresentaram um único padrão,
342 demonstrando a relação clonal entre essas cepas, indicando ser o mesmo sorovar,
343 possivelmente Typhimurium, e provavelmente o mesmo clone, sugerindo uma contaminação
344 da sala de abate ou de um manipulador.

345 Como a sorotipagem analisa as expressões do genótipo em um determinado momento,
346 e os marcadores fenotípicos podem não ser expressos de forma estável em qualquer condição
347 (Farber, 1996), resultados incompatíveis podem ocorrer. Os sorovares Typhimurium e
348 Heidelberg pertencem ao mesmo sorogrupo (B) e possuem fórmulas antigênicas muito
349 parecidas o que pode explicar uma inconsistência na sorotipificação, o mesmo não ocorre com
350 sorovar Give (E1) que pertence a outro sorogrupo bastante diferente. Dessa forma, a aplicação
351 de outras técnicas de tipificação torna-se fundamental para melhorar a diferenciação das cepas
352 analisadas, como a subtipificação com a eletroforese em campo pulsado, do inglês *Pulsed-*
353 *field gel electrophoresis* – PFGE, que é baseada no genótipo do microrganismo, minimizando
354 as desvantagens da sorologia.

355 No presente estudo, algumas cepas foram inconclusivas na identificação bioquímica,
356 após as etapas do cultivo tradicional, de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e
357 plaqueamento diferencial, sendo confirmadas como negativas para *Salmonella* após os testes
358 moleculares. Os testes bioquímicos identificam as salmonelas por seus perfis fenotípicos,
359 porém, essas propriedades fenotípicas podem não ser expressas ou apresentar variabilidade
360 devido à ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, podendo levar a reações falso-
361 negativas, ou ser de difícil ou errônea interpretação (Farber et al., 2001; Malorny et al., 2003;
362 Settanni & Corsetti, 2007).

363 Devido à vida curta dos produtos cárneos, métodos mais rápidos de diagnóstico são
364 necessários. Existem muitas discussões sobre a aplicabilidade da PCR para detecção de
365 *Salmonella*, uma vez que os resultados obtidos por meio dessa técnica podem não ser válidos,
366 já que a técnica detecta bactérias viáveis ou não (Ibrahim, Abd El-Ghany, Nasef & Hatem,
367 2014; Malorny et al., 2003). O método de PCR pode, algumas vezes, detectar bactérias mortas
368 ou injuriadas, que não teriam o impacto de causar uma infecção no hospedeiro. Por isso, a
369 complementação do diagnóstico é muitas vezes necessária, seja pela possibilidade de falso-
370 negativos devido a substâncias inibitórias, bem como falso-positivos, pela detecção da
371 bactéria morta, não cultivável ou degradada (Wilson, 1997). Dessa forma, a PCR realizada a
372 partir das colônias minimizaria esse erro, podendo aumentar a sensibilidade da técnica, pois, a
373 associação de dois ou mais caldos de enriquecimento, com meios de plaqueamento, permite
374 maior número de isolamentos de *Salmonella*, por aumentar a possibilidade de recuperação
375 (Busse, 1995; Rall, Rall, Aragon & Silva, 2005). Além disso, a PCR a partir das colônias
376 isoladas no plaqueamento seletivo economizaria dois dias no método tradicional de cultivo e
377 minimizaria o trabalho despendido e os erros de interpretação dos testes bioquímicos.

378 O perfil de sensibilidade a antimicrobianos permite a rastreabilidade da propagação de
379 cepas multirresistentes (Olsen, Brown, Skov & Christensen, 1993; Oueslati et al., 2016). No
380 caso das salmonelas, Hur, Jawale & Lee (2012) relatam o aumento de sorotipos
381 multirresistentes, como Typhimurium e Newport. O sorotipo Typhimurium fagotipo DT
382 apresenta um gene codificado para resistência a cinco antibióticos: ampicilina, cloranfenicol,
383 estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina – ACSSuT (Hur, Jawale & Lee, 2012), e já foi
384 isolado de humanos e de amostras de carne suína, sugerindo a transferência da resistência aos
385 humanos por meio do consumo da carne (Boxstael et al., 2012).

386 Os isolados Typhimurium do presente estudo, apresentaram 100% de susceptibilidade
387 à ampicilina e à tetraciclina, sugerindo que esses isolados não possuem a ilha genômica penta-
388 resistente.

389 Por fim, a prevalência de *Salmonella* spp. na carne bovina é bastante variável e
390 depende de inúmeros fatores, como condições climáticas, tipo de manejo, condições de abate
391 e de armazenamento e transporte das carcaças. A contaminação cruzada e as práticas
392 incorretas de manipulação estão frequentemente associadas à contaminação da carne bovina,
393 dificultando principalmente a identificação da fonte primária de infecção (Perez-Rodriguez et
394 al., 2010).

395

396 **5. Conclusão**

397

398 *Salmonella* foi encontrada em apenas um dos abatedouros-frigoríficos investigados, no
399 qual mostrou uma baixa prevalência. Porém, na técnica de PFGE as amostras de *Salmonella*
400 apresentaram um único padrão, demonstrando a relação clonal entre essas cepas, indicando
401 ser o mesmo sorovar, Typhimurium, e provavelmente o mesmo clone, sugerindo uma
402 contaminação da sala de abate ou de um manipulador.

403 Além disso, a ocorrência de carcaças bovinas contaminadas com *Salmonella* spp. foi
404 observada após a refrigeração, o que pode ser um risco direto para o consumidor, uma vez
405 que, após esse processo, o produto já está pronto para a desossa e comercialização.

406

407 **Agradecimentos**

408

409 Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado
410 de Mato Grosso do Sul (Fundect) (projeto 23/200.479/2014), Universidade Católica Dom
411 Bosco e Embrapa (projeto 03.14.00.047.00.00).

412

413 **Referências**

414

415 ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Exportações**
416 **Brasileiras de Carne Bovina**. Janeiro a Dezembro de 2015. Disponível em
417 <<http://www.abiec.com.br/download/relatorio-anual-2015.pdf>>. (Acesso em 11/2016).

418

419 Barros, M.F.A., Nero, L.A., Monteiro, A. A. & Beloti, V. (2007) Identification of main
420 contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. *Food*
421 *Science and Technology*, 27(4), 856-862.

422

423 Bell, R.G. (1997) Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses.
424 *Journal of Applied Microbiology*, 82(3), 292-300.

425

- 426 Borch, E. & Arinder, P. (2002) Bacteriological safety issues in red meat and ready-treat meat
427 products, as well as control measures. *Meat Science*, 62(3), 381- 390.
428
- 429 Boxstael, S. V.; Dierick, K.; Van Huffel, X.; Uyttendaele, M.; Berkvens, D.; Herman, L.;
430 Bertrand, S.; Wildemaewe, C.; Catry, B.; Butaye, P. & Imberechts, H. (2012) Comparison of
431 antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella* Typhimurium isolated from
432 pigs, pork and human in Belgium between 2001 and 2006. *Food Research International*, 45,
433 913-918.
434
- 435 Brasil. (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 12 de
436 02 de janeiro de 2001. Regulamento Teórico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos.
437 Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasil, n. 7-E, p. 46-53, 10 de janeiro de
438 2001, seção 1.
439
- 440 Brasil. (2004). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa
441 Agropecuária – SDA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA.
442 Divisão de Controle do Comercio Internacional – DCI. Circular Nº463/DCI/DIPOA/2004 –
443 Programas de autocontroles de estabelecimento produtor de carne bovina habilitados para os
444 Estados Unidos (EUA) e para Estados-Membros da União Européia (UE).
445
- 446 Brasil. (2015). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Relações
447 Internacionais do Agronegócio - SRI. Estatísticas de Comercio Exterior do Agronegócio
448 Brasileiro – AGROSTAT. Resultados de 2015, Perspectivas para 2016. Disponível em:
449 http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/acs/apresentacao1.pdf. (Acesso em 06/2016)
450
- 451 Brasil. (2016). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística da
452 Produção Pecuária - Março de 2016. Comissão Especial de Planejamento, Controle e
453 Avaliação das Estatísticas Agropecuárias – CEPAGRO. Disponível em:
454 [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat-e-leite-couro-ovos_201504_publ_completa.pdf)
455 [e-leite-couro-ovos_201504_publ_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat-e-leite-couro-ovos_201504_publ_completa.pdf). (Acesso em 06/2016)
456
- 457 Busse, M. (1995). Media for *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 26(1),
458 117-131.
459
- 460 Carriço, J. A., Pinto, F. R., Simas, C., Nunes, S., Sousa, N. G., Franzão, N., de Lencastre, H.
461 & Almeida, J. S. (2005). Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type
462 and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis.
463 *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5483–5490.
464
- 465 CLSI. (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first
466 Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, 31(1).
467
- 468 Commission Regulation – European Commission Nº 1441/2007 (amending Regulation (EC)
469 Nº 2073/2005). (2007). Microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the*
470 *European Union*, L322, p. 12 -29.
471
- 472 Dickson, J. S. (1988). Reduction of bacteria attached to meat surfaces by washing with
473 selected compounds. *Journal of Food Protection*, 51(11), 869-873.
474

- 475 Dean, A. G., Sullivan, K. M & Soe, M. M. (2013). OpenEpi: Open Source Epidemiologic
476 Statistics for Public Health, Versão. Disponível em: www.OpenEpi.com, updated 2013/04/06.
477 (Acesso em 07/2016)
478
- 479 EFSA – European Food Safety Authority. (2006). The Community summary report on trends
480 and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in
481 the European Union in 2005. The EFSA Journal, 94, 3–288.
482
- 483 Farber, J. M. (1996). An introduction to the hows and whys of molecular typing. Journal of
484 Food Protection, 59, 1091-1101.
485
- 486 Farber, J. M., Gendel, S. M., Tyler, K. D., Boerlin, P., Landry, W. L., Fritschel, S. C. &
487 Barrett, T. J. (2001). Molecular typing and differentiation, Chapter 11. In: Compendium of
488 Methods for the Microbiological Examination of foods. 4th eds, pp. 127-156. Washington,
489 D.C.: American Public Health Association.
490
- 491 FDA. Food and Drug Administration. (2009). Guidance on Review Criteria for Assessment of
492 Antimicrobial Susceptibility Devices. Disponível em:
493 <[http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceD](http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071462.pdf)
494 [ocuments/ucm071462.pdf](http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071462.pdf)>. (Acesso em 11/2016).
495
- 496 Gill, C.O. & McGinnis, J.C. (2003). Microbiological effects of hand washing at a beef
497 carcass-breaking facility. Journal of Food Protection, 66(3), 493-496.
498
- 499 Gkana, E., Lianou, A. & Nychas, G.J. (2016). Transfer of *Salmonella* enterica Serovar
500 Typhimurium from Beef to Tomato through Kitchen Equipment and the Efficacy of
501 Intermediate Decontamination Procedures. Journal of Food Protection, 79(7), 1252-8.
502
- 503 Hunter, P. R. & Gaston, M. A. (1988). Numerical Index oh the discriminatory ability of
504 typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity. Journal of Clinical
505 Microbiology, 26(11), 2465-2466.
506
- 507 Hur, J.; Jawale, C. & Lee, J. H. (2012). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from
508 food animals: A review. Food Research International, 45, 819–830.
509
- 510 Ibrahim, W. A.; Abd El-Ghany, W.A.; Nasef, S.A. & Hatem, M.E. (2014). A comparative
511 study on the use of real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and standard isolation
512 techniques for the detection of *Salmonellae* in broiler chicks. International Journal of
513 Veterinary Science and Medicine, 2(1), 67–71.
514
- 515 International Organization for Standardization. (2002) ISO 6579:2002: microbiology of food
516 and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
517 Switzerland: ISO:2002. 20p.
518
- 519 Jay, J.M. (2000). Fresh meats and poultry. In J. M. Jay (Ed.), Modern food microbiology:
520 Aspen Publishers, Inc, 59–85.
521
- 522 Lambert, A. D.; Smith, J. P. & Dodds, K. L. (1991). Shelf life extension and microbiological
523 safety of fresh meat. A review. Food Microbiology, 8(4), 267-97.
524

- 525 Madden, R. H., Murray, K. A., & Gilmour, A. (2004). Determination of the principal points
526 of product contamination during beef carcass dressing processes in Northern Ireland. *Journal*
527 *of Food Protection*, 63, 1494–1496.
528
- 529 Malorny, B., Tassios, P.T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M. & Hoorfar, J. (2003)
530 Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. *International Journal*
531 *of Food Microbiology*, 83(1), 39-48.
532
- 533 Michener, H.D., Elliott, R. P. (1964). Minimum growth temperatures for food-poisoning,
534 fecal-indicator, and psychrophilic microorganisms. *Advances in Food Research*. 13, 349-96.
535
- 536 Myint, M. S.; Johnson, Y. J.; Tablante, N. L. & Heckert, R. A. (2006). The effect of pre-
537 enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally
538 contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food*
539 *Microbiology*, 23, 599-604.
540
- 541 Olsen, J. E.; Brown, D. J.; Skov, M. N. & Christensen, J. P. (1993). Bacterial typing methods
542 suitable for epidemiological analysis applications in investigations of salmonellosis among
543 livestock. *Veterinary Quarterly*, 15(4), 125-135.
544
- 545 Oueslati, W., Rjeibi, M. R., Mhadhbi, M., Jbeli, M., Zrelli, S., Ettriqui, A. (2016). Prevalence,
546 virulence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. strains, isolated from beef in Greater
547 Tunis (Tunisia). *Meat Science*, 119, 154-9.
548
- 549 Papadopoulou, O. S.; Choriantopoulos, N. G.; Gkana, E. N., Grounta, A. V., Koutsoumanis,
550 K. P., Nychas, G. J. (2012). Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef
551 filets through meat mincing machine. *Meat Science*, 90, 865–869.
552
- 553 Penney, N.; Bigwood, T.; Barea, H.; Pulford, D.; Leroux, G.; Cook, R.; Jarvis, G. &
554 Brighthwell, G. (2007). Efficacy of a peroxyacetic acid formulation as an antimicrobial
555 intervention to reduce levels of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 on external carcass
556 surfaces on hot-boned beef and veal. *Journal of Food Protection*, 70(1), 200-203.
557
- 558 Perez-Rodriguez, F.; Castro, R.; Posada-Izquierdo, G. D., Valero, A., Carrasco, E., García-
559 Gimeno, R. M. & Zurera, G. (2010). Evaluation of hygiene practices and microbiological
560 quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. *Meat Science*, 86, 479–
561 485.
562
- 563 Podpečan, B., Pengov, A. & Vadnjal, S. (2007). The source of contamination of ground meat
564 for production of meat products with bacteria *Staphylococcus aureus*. *Slovenian Veterinary*
565 *Research*, 44, 25-30.
566
- 567 Pordesimo, L. O., Wilkerson, E. G., Womac, A. R. & Cutter, C. N. (2002). Process
568 engineering variables in the spray washing of meat and produce. *Journal of Food Protection*,
569 65(1), 222-237.
570
- 571 Prasai, R. K., Phebus, R. K., Zepeda, C. M. G., Kastner, C. L., Boyle, A. E. & Fung, D. Y. C.
572 (1995). Effectiveness of trimming and/or washing on microbiological quality of beef
573 carcasses. *Journal of Food Protection*, 58, 1114-1117.
574

- 575 Rahkio, M. & Korkeala, H. (1996). Microbiological contamination of carcasses related to
576 hygiene practice and facilities on slaughtering lines. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 37, 219-
577 28.
- 578
- 579 Rall, V. L. M.; Rall, R.; Aragon, L. C. & Silva, M. G. (2005). Evaluation of three enrichment
580 broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. *Brazilian Journal of*
581 *Microbiology*, 36(2), 147-150.
- 582
- 583 RASFF - Rapid Alert System for Food and Feed - European Commission. (2016).
584 Notifications by product category and notifying country. RASFF Portal, Disponível em:
585 <<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>>. (Acesso em
586 07/2016)
- 587
- 588 Raufu, I. A., Lawanb, F.A., Belloc, H.S., Musad, A.S., Amehb, J.A. & Ambalie, A.G. (2014)
589 Occurrence and antimicrobial susceptibility profiles of *Salmonella* serovars from fish in
590 Maiduguri, sub-Saharah, Nigeria. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40(1), 59-63.
- 591
- 592 Rhoades, J. R.; Duffy, G. & Koutsoumanis, K. (2009). Prevalence and concentration of
593 verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the
594 beef production chain: a review. *Food Microbiology*, 26(4), 357-376.
- 595
- 596 Ribot, E. M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., &
597 Barrett, T. J. (2006). Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the
598 Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne*
599 *Pathogens and Disease*, 3(1), 59-67.
- 600
- 601 Settanni, L. & Corsetti, A. (2007). The use of multiplex PCR to detect and differentiate food
602 and beverage-associated microorganisms: a review. *Journal of Microbiological Methods*,
603 69(1), 1-22.
- 604
- 605 Silley, P. (2012). Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these
606 terms really mean?. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*,
607 31(1), 33-41.
- 608
- 609 Skyberg, J. A.; Logue, C. M. & Kolan, L.K. (2006). Virulence Genotyping of *Salmonella* spp.
610 with Multiplex PCR. *Avian Diseases*. 50(1), 77-81.
- 611
- 612 WHO - World Health Organization. (2005) Drug-resistant *Salmonella*. Food Safety
613 Department. Fact sheet n. 139. Disponível em:
614 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. (Acesso em 06/2016)
- 615
- 616 Wilson, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and*
617 *Environmental Microbiology*. 63(10), 3741-3751.
- 618

ARTIGO 2

Pesquisa de *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) e coliformes termotolerantes em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouros-frigoríficos exportadores

Artigo para submissão:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

1 **Relevância do trabalho:** A investigação de *E. coli* genérica e enumeração de coliformes
2 termotolerantes em carcaças bovinas pode fornecer informações úteis para prever a
3 possibilidade de contaminação por patógenos durante o processamento de abate, e pode
4 contribuir para a verificação das condições higiênicas do estabelecimento e da eficácia dos
5 processos utilizados na prevenção de contaminações. Além disso, a identificação da presença
6 de microrganismos potencialmente patogênicos, como *E. coli* verotoxigênica, possibilita a
7 implantação de programas de monitoramento da qualidade e de medidas preventivas e,
8 conseqüentemente, reduz os riscos à saúde do consumidor.

9

10 **Pesquisa de *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) e coliformes termotolerantes em**
11 **carcaças bovinas durante o processamento em abatedouros-frigoríficos exportadores**

12

13 *Escherichia coli* verotoxigênica em carcaças bovinas

14

15 Daniele Bier – Bier, D. – danielebier@ucdb.br

16 Márcio Roberto Silva – Silva, M. R. – marcio-roberto.silva@embrapa.br

17 Giuliani D’Amico Moriningo – Moriningo, G. D. – giulianidm@gmail.com

18 Alaiza Corrêa de Lima – Lima, A. C. – alaizacorrea@gmail.com

19 Jenyfer Valesca Monteiro Chulli – Chulli, J. V. M. – jeny_chulli@hotmail.com

20 Tâmiris Aparecida dos Santos Silva – Silva, T. A. S. – tamirisassilva@gmail.com

21 Flávio Ribeiro de Araújo* – Araújo, F. R. – flabio.araujo@embrapa.br

22

23 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e
24 Zootecnia, Campo Grande, MS, Brasil;

25 Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brasil.

26 *Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia nº 830, Zona Rural, 79106-550, Campo Grande,
27 MS, Brasil, Telefone: (+5567) 3368-2069, Fax: (+5567) 3368-2150. *Autor de
28 correspondência: flabio.araujo@embrapa.br

29

30 **Resumo**

31 Investigou-se *E. coli* genérica e verotoxigênica e enumerou-se os coliformes termotolerantes
32 em carcaças bovinas em três abatedouros-frigoríficos exportadores de Mato Grosso do Sul,
33 em diferentes pontos do processo de abate (esfola, lavagem e refrigeração), e avaliou-se o
34 perfil de sensibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos. Do total de carcaças analisadas
35 (n=90), 39 (43,3%) apresentaram *E. coli* genérica. Com relação à positividade por ponto de
36 coleta, das 270 amostras, 25 (9,3%) foram positivas após a esfola, 14 (5,2%) após a lavagem e
37 9 (3,3%) após a refrigeração. O maior isolamento de *E. coli* foi nas amostras coletadas após a
38 esfola, que é considerado um ponto crítico com relação a contaminação microbiana das
39 carcaças. Porém, após a etapa de lavagem foram encontradas as maiores concentrações de
40 coliformes termotolerantes. A etapa da refrigeração se mostrou uma importante etapa para
41 diminuir a quantidade de microrganismos indicadores de higiene durante as etapas do abate.
42 Os isolados de *E. coli* apresentaram alta sensibilidade a gentamicina e a ciprofloxacina, e
43 maiores índices de resistência a imipenem e ampicilina. Nenhuma cepa de *E. coli* apresentou
44 quaisquer um dos genes *stx1* e *stx2*, associado à virulência dessa bactéria.

45

46 **Palavras-chave:** carne, enterobactéria, matadouro, resistência bacteriana.

47

48 **Practical Application:** Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC)
49 em carcaças bovinas.

50

51

52 **1 Introdução**

53 O grupo de coliformes totais é utilizado para indicar as condições higiênico-sanitárias
54 dos alimentos, e é composto pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e
55 *Citrobacter*, pertencentes à família Enterobacteriaceae. O grupo dos coliformes fecais,
56 também denominados termotolerantes ou coliformes a 45 °C, é formado por bactérias
57 pertencentes ao grupo dos coliformes totais que apresentam a capacidade de continuar
58 fermentando lactose com produção de gás, em temperaturas de 45 °C, sendo o principal
59 representante o gênero *Escherichia* (Evangelista, 2001). As contagens de coliformes
60 termotolerantes ou *E. coli* podem estimar falhas na higiene e indicar contaminação de origem
61 fecal, sendo que elevadas contagens destes grupos de microrganismos podem estar
62 relacionadas a níveis significativos de enteropatógenos, como *Salmonella* spp. e *E. coli*
63 enterohemorrágica (Jay, 2000; Gill et al., 1996).

64 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), verotoxigênica (VTEC) ou produtora de
65 toxina de Shiga (STEC), tem sido associada a surtos graves e é amplamente reconhecida
66 como um importante patógeno ameaçador desde a década de 1980 (Davis & Brogan, 1995;
67 Duffy et al., 2006). Essa linhagem de *E. coli* produtora de shigatoxinas pode ser isolada nas
68 fezes de muitos animais, incluindo ruminantes (bovinos, ovinos e bubalinos) e não ruminantes
69 (equinos, caninos e suínos) (Rivas et al., 2006).

70 Vários alimentos já foram incriminados em surtos de VTEC, como leite cru, produtos
71 cárneos fermentados, queijos, sucos não pasteurizados, frutas e vegetais (Gyles, 2007;
72 Karmali et al., 2010), entretanto, o maior risco está associado ao consumo de carne bovina
73 (Karmali et al., 2010; Nataro & Kaper, 1998). Esse sorotipo é um dos principais que podem
74 contaminar a carne, e pode ser potencialmente transferido do intestino ou da pele durante o
75 abate (Duffy et al., 2006). Além disso, essa bactéria pode sobreviver por horas ou dias em

76 mãos, panos ou utensílios, ocasionando uma contaminação cruzada em casos de incorretas
77 práticas de higiene (Chen et al., 2001; Kusumaningrum et al., 2003).

78 Os mercados importadores dos produtos cárneos brasileiros são bastante exigentes
79 quanto à qualidade e a segurança microbiológica dos produtos, estabelecendo, de forma geral,
80 a análise da presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Por meio do Sistema de
81 Alerta Rápido para Alimentos da União Europeia (*Rapid Alert System for Food and Feed -*
82 *RASFF*), quando ocorre a identificação de um alimento que seja um risco para a saúde
83 humana, medidas são estabelecidas para retenção, notificação, apreensão ou rejeição desses
84 produtos perigosos. Somente de maio de 2015 a maio de 2016, nove cargas de carne bovina
85 brasileira foram retidas e notificadas pela presença da bactéria *E. coli* produtora de Shiga
86 toxina (RASFF, 2016).

87 A análise de microrganismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária em
88 alimentos, como os coliformes termotolerantes, pode fornecer informações úteis para prever a
89 possibilidade de contaminação por patógenos. Em abatedouros-frigoríficos de bovinos, essa
90 análise pode ser de grande valia para verificar as condições higiênicas do estabelecimento e a
91 eficácia dos processos utilizados para evitar a contaminação por patógeno. Além disso, a
92 identificação da presença de microrganismos potencialmente patogênicos, como *E. coli*
93 verotoxigênica, nas carcaças de bovino durante as operações de abate podem contribuir de
94 forma significativa com a implantação de programas de monitoramento da qualidade e de
95 medidas preventivas e, conseqüentemente, reduz os riscos à saúde do consumidor.

96 Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar, em três pontos diferentes do
97 processo de abate (esfolagem, lavagem e refrigeração), a presença de *E. coli* genérica e
98 verotoxigênica em carcaças bovinas em abatedouros-frigoríficos exportadores de Mato
99 Grosso do Sul, enumerar os coliformes termotolerantes nas amostras coletadas, e avaliar o
100 perfil de sensibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos.

101 2 Material e Métodos

102 Foram coletadas amostras de carcaças de bovinos em três abatedouros-frigoríficos
103 exportadores, localizados no Estado de Mato Grosso do Sul, que funcionam sob Inspeção
104 Federal. Em cada estabelecimento foram amostradas cinco carcaças por semana durante seis
105 semanas consecutivas, conforme estabelecido pela União Europeia para testes
106 microbiológicos em carcaças (Commission Regulation – EU, 2007). As carcaças amostradas
107 eram de bovinos da raça Nelore, sem distinção de sexo e idade, oriundos de lotes diversos de
108 diferentes propriedades de Mato Grosso do Sul.

109 Foram coletadas, pelo método não destrutivo, amostras da carcaça de um mesmo
110 animal, e mesma meia carcaça, em três pontos diferentes da linha de abate: depois da esfolagem,
111 imediatamente depois da lavagem e após a refrigeração de aproximadamente 24 horas.

112 Para a detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) nas amostras
113 colhidas das carcaças bovinas a metodologia utilizada foi a descrita no *Compendium of*
114 *Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 2001 (Meng et al., 2001).

115 Para coleta das amostras foram utilizadas esponjas de 11,5 x 23,0 cm desidratadas e
116 esterilizadas (Speci-Sponge® - Nasco, EUA). As esponjas foram hidratadas adicionando-se
117 10 mL de Água Peptonada Tamponada 1% (APT 1%) esterilizada ao saco plástico de
118 acondicionamento das esponjas (Whirl Pak® - Nasco, EUA). Com o uso de luvas, as esponjas
119 foram friccionadas em uma área de 100 cm² no peito do animal, 100 cm² no vazio e 200 cm²
120 na região próxima ao lagarto (onde é realizado o procedimento de oclusão do reto durante o
121 abate), utilizando o mesmo molde e a mesma esponja, tomando o cuidado de fazer a colheita
122 dos pontos de menor contaminação seguido pelos pontos de maior contaminação,
123 teoricamente, nessa ordem: vazio, peito e lagarto. Os pontos de amostragem selecionados são
124 aqueles descritos nos regulamentos da Comissão Europeia (*Commission Regulation – EU,*
125 2007) como as áreas mais susceptíveis de serem contaminadas durante o abate, devendo a

126 área total cobrir no mínimo 400 cm². A coleta foi realizada utilizando um molde de aço inox
127 esterilizado, com 10 x 10 cm, abrangendo pelo menos 100 cm² por ponto de amostragem,
128 totalizando 400 cm² de superfície amostrada. Este procedimento foi adotado para a coleta dos
129 três pontos do abate amostrados. As esponjas foram transferidas para a bolsa plástica e
130 transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável.

131 Em cada bolsa plástica contendo a esponja foram adicionados 200 mL de APT, e a
132 mistura homogeneizada em *stomacher* por 60 segundos. Uma alíquota de 25 mL da amostra
133 homogeneizada do *stomacher* foi adicionada em 225 mL de caldo *Escherichia coli* (EC),
134 seguido de incubação a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por 18 ± 2 h.

135 O caldo foi estriado em placas de Petri contendo ágar MacConkey Sorbitol (SMAC) e
136 ágar MacConkey Sorbitol com suplemento Cefixime-Telurito (SMAC-CT). Após a incubação
137 das placas a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ por 18 a 24 h, cinco a dez colônias, sorbitol positivas e negativas,
138 foram selecionadas e transferidas com auxílio de agulha de níquel cromo para o meio Extrato
139 de Levedura Triptona Soja (TSAye) e incubadas a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ por 18 a 24 h.

140 As colônias suspeitas de *E. coli* foram isoladas em ágar nutriente, incubadas a 35 ± 1
141 $^\circ\text{C}$ por 18 a 24 h, e submetidas às provas bioquímicas complementares, composto pelas provas
142 de indol, ureia, motilidade, produção de H₂S, vermelho de metila, Voges-Proskauer,
143 fermentação de carboidratos (*Triple Sugar Iron*) e citrato.

144 A quantificação dos coliformes termotolerantes nas amostras foi realizada pela técnica
145 do Número Mais Provável (NMP), conforme Kornacki & Johnson (2001), realizada em
146 triplicata. Da amostra homogeneizada em APT do *stomacher*, após o período de incubação,
147 foi transferido 1 mL de cada homogeneizado para tubos contendo 10 mL de APT (diluição 10⁻¹
148 ¹) e submetida às diluições decimais seriadas até 10⁻³, em APT. Um mL de cada uma das
149 diluições foi transferido para três séries de tubos, contendo caldo Lauril Sulfato Triptose
150 (LST) e um tubo de Durhan invertido, seguido de incubação a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 ± 3 h. Os

151 caldos que apresentaram turvação e gás nos tubos de Durhan, considerados positivos para
152 coliformes totais, foram transferidos para tubos contendo o caldo EC, seguido de incubação a
153 $45 \pm 0,5^\circ \text{C}$ por $48 \pm 3 \text{ h}$.

154 Novamente, os tubos que apresentarem turvação e gás nos tubos de Durhan foram
155 considerados positivos para coliformes termotolerantes. De acordo com o número de tubos
156 positivos para cada diluição testada, foi determinado o NMP de coliformes conforme tabela
157 publicada pelo BAM (2010). O valor obtido na tabela foi o equivalente ao NMP por mililitro
158 de amostra. Como a amostra foi composta por 200 mL de APT, o qual foi suspenso o material
159 colhido pela esponja friccionada numa área de 400cm^2 de carcaça, cada mililitro da amostra
160 foi o equivalente a uma área de 2 cm^2 da mesma (Silva, 2010).

161 O perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *E. coli* foi determinado de
162 acordo com *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), por meio da técnica de
163 disco-difusão (CLSI, 2011), empregando-se os antimicrobianos: ampicilina, cefotaxima,
164 ciprofloxacina, gentamicina, imipenem e tetraciclina, de acordo com a indicação da *United*
165 *States Food and Drug Administration* (U.S. FDA) para membros da família
166 Enterobacteriaceae (FDA, 2009).

167 Para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real
168 (qPCR), as amostras das bactérias em suspensão em caldo tripton de soja (TSB) foram
169 utilizadas para a extração de DNA, utilizando o *kit* comercial DNeasy Blood & Tissue Kit
170 (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

171 Os isolados bioquimicamente confirmados como *E. coli* foram submetidas a técnica de
172 PCR para pesquisa dos genes *stx1* e *stx2* (Paton & Paton, 1998).

173 Os produtos da amplificação foram corados com GelRedTM (Biotium, Hayward, CA,
174 EUA), separados em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato EDTA – pH 8,2 (TAE 1x)

175 e realizada a eletroforese. Após, a imagem foi registrada em um fotodocumentador L-PIX
176 Image EX (Loccus Biotecnologia - Loccus do Brasil, Cotia, SP, Brasil).

177 Para a qPCR, iniciadores e sondas de DNA para sistema TaqMan MGB foram
178 desenhados com o programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a
179 detecção de DNA foi realizada em aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City,
180 CA, EUA). Os *primers* e sondas desenhados para sistema TaqMan MGB para pesquisa do
181 gene de virulência *stx1*, com fragmento de 59 pb foram: *Foward*
182 5'ACCCACCCGGGCAGTTA3', *Reverse* 5'CGCGCCTGATAGACATCAAG3' e *Probe*
183 6FAMTTTGCTGTGGATATACGMGBNFQ. Para o gene *stx2*, com fragmento de 56 pb
184 foram: *Foward* 5'TTCGCGCCGTGAATGAA3', *Reverse*
185 5'GGGCCTGTGCGCCAGTTATC3' e *Probe* VICAGAGTCACCCAGAATGTMGBNFQ.

186 Cepas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CRMVS,
187 FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, foram utilizadas como controles positivos e negativos
188 para todas as técnicas: *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), *Escherichia coli*
189 INCQS 00171 (CDC EDL-933), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis
190 INCQS 00258 (ATCC 13076) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium
191 INCQS 00150 (ATCC 14028).

192 Para a análise estatística, os valores de amostras positivas apresentadas em cada
193 período de avaliação, depois da esfolagem, após a lavagem e após a refrigeração, foram
194 comparados entre si com o software OpenEpi (Dean et al., 2013). Para avaliar se existia
195 alguma associação entre cada dois períodos de avaliação e a presença ou ausência de *E. coli*
196 foi utilizado o teste Exato de Fisher com método mid-P para amostras pareadas.

197

198

199

200 3 Resultados e Discussão

201 Em relação à presença de *Escherichia coli* genérica em carcaças bovinas, 11/30
202 (36,7%) foram positivas no abatedouro-frigorífico I, 21/30 (70%) no abatedouro-frigorífico II,
203 e 7/30 (23,3%) no frigorífico III (Tabela 1).

204 Do total de carcaças analisadas nos três abatedouros (n=90), 39 (43,3%) apresentaram
205 *E. coli*. O estudo de Sumner et al. (2003) na Austrália, avaliando a presença de *E. coli*
206 genérica em carcaças bovinas em quatro abatedouros-frigoríficos, encontrou 18,8% de
207 carcaças positivas. Nesse estudo, porém, os autores utilizaram uma área de amostragem
208 menor, 200 cm² por carcaça, diferentemente do presente estudo que trabalhou com 400 cm², o
209 que pode ter possibilitado uma maior recuperação de bactérias e uma maior porcentagem de
210 carcaças contaminadas. De forma parecida, dados do Serviço de Inspeção e Segurança
211 Alimentar do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-FSIS) demonstraram
212 a ocorrência da bactéria em 16,6% dos estabelecimentos sob inspeção federal (Eblen et al.,
213 2005). O USDA-FSIS considera que *E. coli* genérica (ou não-patogênica) é o melhor
214 indicador microbiológico de contaminação fecal em carcaças de bovinos, pois, a principal
215 forma de contaminação por bactérias patogênicas, como *E. coli* enterohemorrágica, é por
216 meio das fezes (USDA-FSIS, 1996). O nível de contaminação por *E. coli* nas carcaças
217 bovinas pode sofrer grande variação, relacionado não apenas à contaminação fecal, mas por
218 meio de outros fatores, como a esfolagem e a evisceração do animal, ou prática de higiene
219 inadequadas (Rigobelo et al., 2006).

220 Na tabela 1 são apresentadas as taxas de contaminação por ponto de coleta em cada
221 abatedouro-frigorífico analisado.

222

223 Tabela 1 – Amostras de carcaças bovinas contaminadas por *Escherichia coli* encontradas após
 224 a esfolagem, lavagem e refrigeração, em três abatedouros-frigoríficos destinados à exportação de
 225 carne, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Abatedouro- Frigorífico	Número de carcaças	Carcaças positivas	Esfola	Lavagem	Refrigeração
I	30	11 (36,7%)	5 (16,6%)	2 (6,6%)	5 (16,6%)
II	30	21 (70%)	14 (46,6%)	9 (30%)	3 (10%)
III	30	7 (23,3%)	6 (20%)	3 (10%)	1 (3,3%)
Total	90	39 (43,3%)	25 (27,8%)	14 (15,5%)	9 (10%)

226
 227 No abatedouro 1 não foram detectadas diferenças significativas na relação
 228 negatificação/positivação das carcaças entre cada dois pontos analisados. No abatedouro 2
 229 foram detectadas chances 3 vezes maiores de negatificação da contaminação das carcaças entre
 230 lavagem e refrigeração e 6,5 vezes maiores entre esfolagem e refrigeração ($p < 0,05$). Ou seja,
 231 houve uma tendência significativa de negatificação da contaminação da esfolagem até a
 232 refrigeração e esta tendência de queda da contaminação foi mais acentuada nos pontos entre
 233 lavagem e refrigeração do que entre esfolagem e lavagem. No abatedouro 3, somente foi detectada
 234 uma chance significativa de negatificação comparando esfolagem e refrigeração, a qual foi de 11
 235 vezes a da positivação ($p < 0,05$). Enfim, foi demonstrada uma tendência de negatificação da
 236 contaminação entre a esfolagem e a refrigeração nos abatedouros 2 e 3, a qual não foi verificada
 237 no abatedouro 1 (Tabela 2).
 238

239 Tabela 2 – Comparações pareadas de amostras de carne bovina contaminados com
 240 *Escherichia coli* em três pontos – após esfola, lavagem e refrigeração - em três frigoríficos
 241 destinados à exportação, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Abatedouro- frigorífico	Comparações de pares combinados		Valores de p do teste		Odds Ratio (IC 95%)
			Exato de Fisher com método mid-P		
	Par 1	Par 2	1-cauda	2-caudas	
I	E	L	0,10	0,21	4 (0,50–98,98)
	L	R	0,14	0,28	0,4 (0,05-2,02)
	E	R	0,50	>0,99	1 (0,26 – 3,71)
II	E	L	0,10	0,21	2 (0,68-6,47)
	L	R	0,046	0,092	3 (0,84-13,74)
	E	R	0,002	0,004	6,5 (1,66-42,5)
III	E	L	0,10	0,21	4 (0,50–98,98)
	L	R	0,18	0,37	3 (0,31-78,99)
	E	R	-	0,041	11* (0,60-198,9)

242 * Correção de Haldane; E, após esfola; L, após lavagem; R, após refrigeração
 243 IC – intervalo de confiança

244

245 A diminuição da contaminação no II e III era o esperado, pois, a esfola do animal é
 246 uma etapa considerada um ponto crítico do abate, devido à possibilidade de contaminação da
 247 superfície da carcaça com microrganismo presentes na pele, pelos e cascos dos animais
 248 (Lambert et al., 1991) e, a lavagem e a refrigeração têm como um dos principais objetivos
 249 diminuir a contaminação microbiana da carcaça (Dickson, 1988; Ordóñez, 2005). Porém, o
 250 aumento da contaminação da lavagem até a refrigeração que aconteceu no abatedouro I pode
 251 ter ocorrido devido à contaminação cruzada durante a manipulação dessas carcaças, por meio
 252 de utensílios, roupas ou mãos dos operários (Roça, 2004; Pardi et al., 2006; Gill & McGinnis,
 253 2003), pois, as baixas temperaturas reduzem o número, mas não provocam a destruição
 254 completa dos microrganismos (Ordóñez, 2005).

255 Em relação à enumeração de coliformes, do total das 270 amostras de carcaças
 256 avaliadas nos três abatedouros frigoríficos, 145 (53,7%) foram negativas (<3 NMP/mL) para a
 257 presença de coliformes termotolerantes, e 125 (46,3%) foram positivas, que variaram entre 4 e
 258 >1100 NMP/mL de coliformes termotolerantes. O principal representante do grupo dos
 259 coliformes termotolerantes é *Escherichia coli*, porém, algumas cepas de *Klebsiella* e
 260 *Enterobacter* apresentam a característica de termotolerância.

261 A Tabela 3 apresenta o número de amostras positivas pela técnica dos tubos múltiplos
 262 das 270 amostras de carcaças bovinas analisadas quanto à presença de coliformes a 45 °C e *E.*
 263 *coli*. Embora 125 amostras (46,3%) apresentaram coliformes termotolerantes, *E. coli* foi
 264 isolada em 48 (17,8%) amostras.

265

266 Tabela 3 – Número de amostras positivas pela técnica dos tubos múltiplos (NMP) em
 267 amostras de carcaças bovinas quanto à presença de coliformes a 45 °C e *Escherichia coli* em
 268 três abatedouros- frigoríficos destinados à exportação, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Abatedouro-frigorífico	N° de amostras		
	Analisadas	Positivas para coliformes termotolerantes	Positivas para <i>E. coli</i>
I	90	50	12
II	90	54	26
III	90	21	10
Total	270	125 (46,3%)	48 (17,8%)

269

270 A Resolução RDC nº 12 de 2001 da ANVISA, que aprova o Regulamento Técnico
 271 Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos não estabelece o limite de coliformes
 272 termotolerantes para carnes resfriadas, ou congeladas, "in natura", de bovinos (Brasil, 2001).
 273 Porém, de acordo com Florentino et al. (1997) a simples presença de coliformes fecais já é

274 considerada indicadora de contaminação por fezes e pode indicar a presença de bactérias
275 patogênicas, implicando em risco ao consumidor. No estudo realizado por Sofos et al. (1999),
276 foi demonstrado que o aumento na contagem de coliformes, aumentava a possibilidade de
277 isolamento de *Salmonella*, auxiliando como indicador da presença do patógeno. Dessa forma,
278 a presença de *E. coli* genérica nas carcaças implica que outros microrganismos de origem
279 fecal, incluindo *E. coli* verotoxigênica, possam estar presentes (Jay, 2000).

280 Das 125 amostras positivas para coliformes termotolerantes, 11 apresentaram
281 contagem igual ou superior a 1100 NMP/mL. Dessas, nove amostras foram isoladas em um
282 mesmo abatedouro-frigorífico. A alta contagem de coliformes termotolerantes presentes
283 nessas amostras sugere que as condições higiênico-sanitárias na produção desse abatedouro
284 não eram satisfatórias, sendo indicativo de contaminação fecal, sugerindo uma incorreta
285 manipulação durante as operações de abate. Nos frigoríficos II e III, apenas uma amostra em
286 cada estabelecimento apresentou níveis de contaminação maior que 1100 NMP/mL. Isso
287 demonstra que nesses estabelecimentos são mantidas melhores condições de higiene e
288 executadas adequadamente as boas práticas de fabricação e os programas de qualidade.

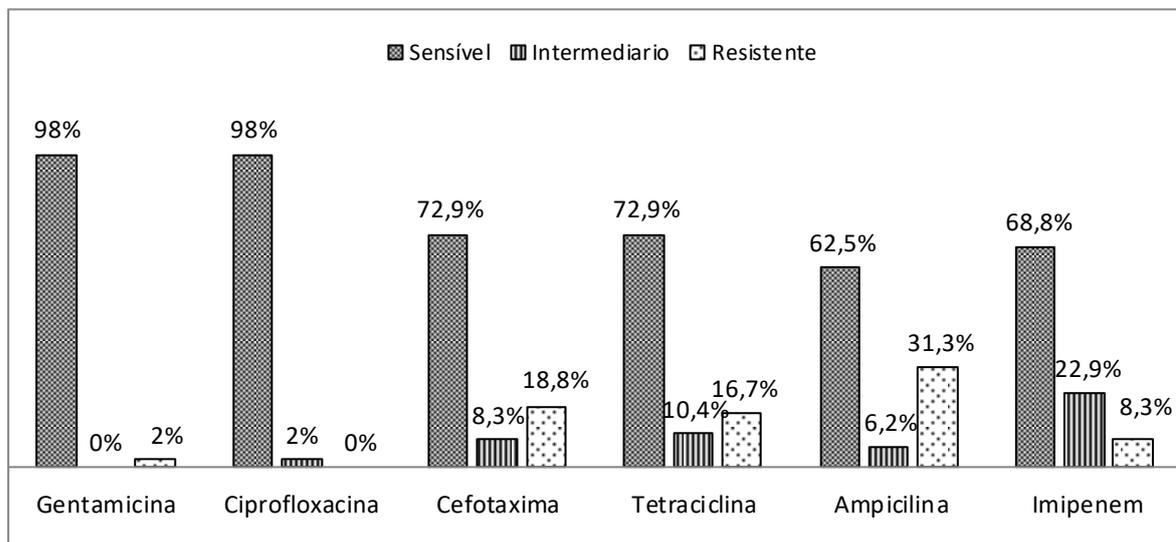
289 Das 11 amostras com contagem de coliformes termotolerantes igual ou maior do que
290 1100 NMP/mL, 9 eram de amostras coletadas após a lavagem. A lavagem com água clorada
291 (0,5-1,0 ppm de cloro) é realizada no final do processo de abate com o objetivo de remover
292 materiais estranhos, como esquirolas ósseas, e reduzir a microbiota que possa estar aderida à
293 superfície (Roça & Serrano, 1994), porém, a etapa da lavagem das carcaças pode disseminar a
294 contaminação bacteriana de uma área para outra (Prasai et al., 1995; Yalçin et al., 2001).
295 Outra explicação para a maior contagem de coliformes após a lavagem é que as etapas
296 anteriores ao chuveiro, e posteriores à esfolagem, podem ser fontes importantes de contaminação,
297 como a evisceração e a serragem da carcaça (Matos et al., 2013). Além disso, outro problema
298 que pode ocorrer durante a lavagem das carcaças é a qualidade higiênico-sanitária

299 insatisfatória da água. Se a água utilizada não for de boa qualidade, essa passa a ser fonte de
 300 contaminação dentro da planta de processamento, pois, pode ser fonte de microrganismos
 301 deteriorantes ou, até mesmo, patogênicos para as carcaças (Amaral et al., 2007).

302 Além do isolamento e identificação, a análise da sensibilidade antimicrobiana de
 303 patógenos incriminados em graves implicações em saúde pública é fundamental no contexto
 304 clínico e epidemiológico (Mota et al., 2005). Em relação ao perfil de sensibilidade aos
 305 antimicrobianos, os isolados de *E. coli* das carcaças dos bovinos apresentaram sensibilidade
 306 de 98% a gentamicina e a ciprofloxacina, 73% a cefotaxima e a tetraciclina, 68,8% a
 307 imipenem e 62,5% a ampicilina (Figura 1).

308

309 **Figura 1** - Perfil de sensibilidade de seis antimicrobianos frente às amostras contaminadas por
 310 *Escherichia coli*.



311

312 A sensibilidade de *E. coli* frente aos antimicrobianos depende do sorotipo da cepa
 313 isolada. Diversos estudos demonstram a variabilidade de resistência antibiótica de cepas de *E.*
 314 *coli* isoladas de animais e alimentos (Meng et al., 1998; Oliveira et al., 1999; Schroeder et al.,
 315 2002; Silva et al., 2008). Por isso, Campo & Trabulsi (1999) relatam que quando o uso de
 316 antibiótico para infecções por *E. coli* é necessário, o antimicrobiano deve ser selecionado pelo

317 antibiograma. Entretanto, muitos trabalhos ainda demonstram a alta sensibilidade a
318 gentamicina (Oliveira et al., 1999; Silva et al. 2008; Franco et al., 2010) como encontrado no
319 presente trabalho (98%).

320 As 48 amostras bioquimicamente confirmadas como *E. coli*, isoladas das carcaças,
321 foram testadas por meio da técnica de PCR para os genes *stx1* e *stx2*, associado à virulência.
322 Verificou-se que nenhuma amostra apresentou fragmentos específicos para os genes *stx*,
323 responsáveis pela síntese da toxina Shiga-like.

324 A maioria dos casos e dos surtos causados pela *E. coli* verotoxigênica têm sido
325 atribuídos ao consumo de carne bovina e suína (Stephan & Schumacher, 2001; Irino et al.,
326 2005). As duas enterotoxinas Shiga (*stx1* e *stx2*), que são produzidas por essa linhagem, são
327 as responsáveis pelas manifestações clínicas no paciente (Strockbine et al., 1988; Jay et al.,
328 2005) e, são os fatores de virulência essenciais na patogênese da doença. No presente estudo,
329 nenhum isolado de *E. coli* apresentou fragmentos específicos para os genes *stx*. Isso também
330 foi reportado em outros trabalhos, no quais não houve isolamento de *E. coli* verotoxigênica
331 em carcaças bovinas e produtos cárneos analisados (Madden et al., 2001; Silva et al., 2001;
332 Matos et al., 2013).

333 Por outro lado, diversos estudos demonstram a presença de EHEC em produtos
334 cárneos bovinos. Em um estudo realizado ao longo de um ano na Inglaterra, os autores
335 isolaram *E. coli* O157 em 1,4% das carcaças (Chapman et al., 2001). Na Suíça, Fantelli &
336 Stephan (2001) isolaram cepas de *E. coli*, que apresentavam os genes produtores de Shiga
337 toxina, *stx1* e *stx2*, em 2,3% de amostras de carne picada.

338 A ausência de cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas (VTEC) em carcaças bovinas
339 abatidas e as baixas prevalências encontradas em inúmeros trabalhos (Chapman et al., 2001;
340 Fantelli & Stephan, 2001; Madden et al., 2001; Silva et al., 2001; Matos et al., 2013) são
341 explicadas por alguns autores que analisaram criticamente os resultados de 26 estudos

342 epidemiológicos publicados sobre a prevalência da contaminação de bovinos por cepas de *E.*
343 *coli* produtoras de verotoxinas (VTEC), argumentado que a prevalência dos valores inferidos
344 são, provavelmente, subestimadas devido às amostragens (Meyer-Broseta et al., 2001).

345

346 **4 Conclusão**

347 O maior isolamento de *E. coli* ocorreu nas amostras coletadas após a esfolagem, que é
348 considerado um ponto crítico com relação a contaminação microbiana das carcaças. Porém,
349 após a etapa de lavagem foram encontradas as maiores concentrações de coliformes
350 termotolerantes. A etapa da refrigeração se mostrou uma importante etapa para diminuir a
351 quantidade de microrganismos indicadores de higiene durante as etapas do abate. Os isolados
352 de *E. coli* apresentaram variabilidade de sensibilidade aos antimicrobianos, apresentando alta
353 sensibilidade a gentamicina e a ciprofloxacina, e menores sensibilidade a imipenem e
354 ampicilina. Nenhuma cepa de *E. coli* apresentou quaisquer um dos genes *stx1* e *stx2*,
355 associado à virulência dessa bactéria.

356

357 **Referências Bibliográficas**

358 Amaral, L. A., Júnior, O. D. R., Filho, A. N., Ferreira, F. L. A. & Hagi, D. D. (2007). Água
359 utilizada em estabelecimentos que comercializam produtos cárneos, na cidade de
360 Jaboticabal/SP, como via de contaminação dos alimentos. *Revista Brasileira de*
361 *Ciências Veterinárias*, 14(1), 3-6.

362 BAM, Bacteriological Analytical Manual. (2010). Appendix 2 – Most Probable Number from
363 Serial Dilutions. Disponível em :
364 <<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm109656.htm>>.
365 Acesso em 30 ago. 2016.

- 366 Brasil. (2001). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12.
367 Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário
368 Oficial da União, Brasília, 10 Janeiro 2001.
- 369 Campos, L.C. & Trabulsi, L. R. (1999). *Escherichia*, p.87-148. In: Trabulsi L.R., Alterthum
370 F., Gompertz O.F. & Candeias J.A.N. *Microbiologia*. 3. ed. Atheneu, Rio de Janeiro.
- 371 Chapman, P.A., Cérdan, M.A.T., Ellin, M., Ashton, R & Harkin, M.A. (2001). *Escherichia*
372 *coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef
373 and lamb products in South Yorkshire, UK. *International Journal of Food*
374 *Microbiology*, 64, 139-150.
- 375 Chen, Y., Jackson, K. M., Chea, F. P. & Schaffner, D. W. (2001). Quantification and
376 variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks.
377 *Journal of Food Protection*, 64, 72–80.
- 378 CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). Performance Standards for
379 Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first Informational Supplement. *Clinical*
380 *and Laboratory Standards Institute*, 31(1).
- 381 Commission Regulation – European Commission N° 1441/2007 (amending Regulation (EC)
382 N° 2073/2005). (2007). Microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the*
383 *European Union*, L322, 12 -29.
- 384 Davis, B. S. & Brogan, R. T. (1995). A widespread community outbreak of *E. coli* O157
385 infection in Scotland. *Public Health*, 109, 381–388.
- 386 Dean, A. G., Sullivan, K. M & Soe, M. M. (2013). OpenEpi: Open Source Epidemiologic
387 Statistics for Public Health, Versão. Disponível em: www.OpenEpi.com, updated
388 2013/04/06. (Acesso em 07/2016)

- 389 Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Pathogen Reduction; Hazard
390 Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems. Federal Register, v. 61, n. 144,
391 1996.
- 392 Dickson, J. S. (1988). Reduction of bacteria attached to meat surfaces by washing with
393 selected compounds. *Journal of Food Protection*, 51(11), 869-873.
- 394 Duffy, G., Cummins, E., Nally, P., O' Brien, S. & Butler, F. (2006). A review of quantitative
395 microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef.
396 *Meat Science*, 74, 76–88.
- 397 Eblen, D.R., Levine, P., Rose, B. E., Saini, P., Mageau, R. & Hill, W. E. (2005). Nationwide
398 microbiological baseline data collected by sponge sampling during 1997 and 1998 for
399 cattle, swine, turkeys, and geese. *Journal of Food Protection*, 68(9), 1848-1852.
- 400 Evangelista, J. (2001). *Tecnologia de Alimentos*. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 652p.
- 401 Fantelli, K. & Stephan, R. (2001). Prevalence and characteristics of Shigatoxin-producing
402 *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in
403 Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 63-69.
- 404 FDA. Food and Drug Administration. (2009). Guidance on Review Criteria for Assessment of
405 Antimicrobial Susceptibility Devices. Disponível em:
406 <<http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071462.pdf>>. Acesso em 04 nov. 2016.
- 408 Florentino, E. R., Leite, Jr, A. F., Sá, S. N., Araújo, M. S. O. & Martins, R. S. (1997).
409 Avaliação da Qualidade Microbiológica da Carne Moída Comercializada em Campina
410 Grande-PB. *Higiene Alimentar*, 11(47).
- 411 Franco, R. M., Mantilha, S. P. S., Gouvêa, R. & Oliveira, L. A. T. (2010). Resistência
412 antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne e dejetos suínos. *Acta Veterinaria
413 Brasílica*, 4(1), 31-36.

- 414 Gill, C. O., McGinnis, J. C. & Badoni, M. (1996). Use of total or *Escherichia coli* counts to
415 assess the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. *International*
416 *Journal of Food Microbiology*, 31(1-3), 181-196.
- 417 Gill, C.O. & McGinnis, J.C. (2003). Microbiological effects of hand washing at a beef
418 carcass-breaking facility. *Journal of Food Protection*, 66(3), 493-496.
- 419 Gyles, C.L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal*
420 *Science*, 85(13), E45-E62.
- 421 Irino, K., Kato, M. A. M. F., Vaz, T. M. I., Ramos, I. I., Souza, M. A. C., Cruz, A. S., Gomes,
422 T. A. T., Vieira, M. A. M. & Guth, B. E. C. (2005). Serotypes and virulence markers of
423 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo
424 state, Brazil. *Veterinary Microbiology*, 105, 29-36.
- 425 Jay, J. M. (2000). Indicators of food microbiological quality and safety. Modern food
426 microbiology. 6.ed. Maryland: Aspen Publication, 387-407.
- 427 Jay, J. M. (2005). *Microbiologia de Alimentos*. Trad. Eduardo César Tondo et al. 6.ed. Porto
428 Alegre: Artmed. 712p.
- 429 Karmali, M. A., Gannon, V. & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia*
430 *coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140 (3-4), 360-370.
- 431 Kornacki, J. L. & Johnson, J. L. (2001). Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as
432 quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. Compendium of
433 methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: APHA, cap.8,
434 p.69-80.
- 435 Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C., Beumer, R. R. (2003). Survival of
436 foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods.
437 *International Journal of Food Microbiology*, 85, 227–236.

- 438 Lambert, A. D., Smith, J. P. & Dodds, K. L. (1991). Shelf life extension and microbiological
439 safety of fresh meat. A review. *Food Microbiology*, 8(4), 267-97.
- 440 Madden, R.H., Espie, W.E., Moran, L., McBride, J. & Scates, P. (2001) Occurrence of
441 *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter*
442 spp. on beef carcasses in Northern Ireland. *Meat Science*, 58, (4), 343-346.
- 443 Matos, A.V. R, Nunes, L. B. S., Vianna, C., Spina, T. L. B., Zuim, C. V., Possebom, F. S.,
444 Xavier, D. M., Ferraz, M. C & Pinto, J. P. A. N. (2013) *Listeria monocytogenes*, *E. coli*
445 O157, *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças bovinas para
446 exportação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(4), 981-988.
- 447 Meng, J.; et al. (1998). Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM
448 Isolated from Animals, Food, and Humans. *Journal of Food Protection* . 61(11), 1511-
449 1514.
- 450 Meng, J. H., Feng, P. & Doyle, M. P. (2001). Pathogenic *Escherichia coli*. In: Downes, F.P.;
451 Ito, K., eds. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*.
452 4.ed. Washington: American Public Health Association, cap.35, p.331-342.
- 453 Meyer-Broseta, S., Bastian, S.N., Arné, P.D., Cerf, O. & Sanaa, M. (2001). Review of
454 epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with
455 *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *International Journal of Hygiene and*
456 *Environmental Health*. 203(4), 347-361.
- 457 Mota, R. A, Silva, K. P. C., Freitas, M. F. L., Porto, W. J. N. & Silva, L. B. G. (2005).
458 Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência
459 bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo,
460 42(6), 465-470.
- 461 Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology*
462 *Reviews*, 11(1), 142-201.

- 463 Oliveira, L.A.T., Ferreira, T., Franco, R.M. & Carvalho, J.C.A.P. (1999). Enumeração de
464 *Escherichia coli* e *Enterococcus* em amostras de hambúrguer de frango,
465 comercializadas em Niterói- RJ. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos das cepas
466 isoladas. *Higiene Alimentar*, 13(63), 49-55.
- 467 Ordóñez, J.A. (2005). Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos.
468 Porto Alegre: Artmed.
- 469 Pardi, M. C., Santos, I. F., Souza, E. R. & Pardi, H. S. (2006). Aspectos higiênico-sanitários
470 da carne. In:_____. Ciência, higiene e tecnologia da carne, part. 4, v. 1 (Ciência e
471 higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação), 2. ed., Goiânia: UFG,
472 271-490.
- 473 Paton, J. C. & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing
474 *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 450-479.
- 475 Prasai, R. K., Phebus, R. K., Zepeda, C. M. G., Kastner, C. L., Boyle, A. E. & Fung, D. Y. C.
476 (1995). Effectiveness of trimming and/or washing on microbiological quality of beef
477 carcasses. *Journal of Food Protection*, 58, 1114-1117.
- 478 RASFF - Rapid Alert System for Food and Feed - European Commission. (2016).
479 Notifications by product category and notifying country. RASFF Portal, Disponível em:
480 <<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>>.
- 481 Rigobelo, E. C., Maluta, R. P., Borges, C. A., Beraldo, L. G., Franco, M. V., Maestá, L. S. A.
482 & Ávila, F. A. (2011). Contamination of cattle carcasses by *Escherichia coli* shiga like
483 toxin with high antimicrobials resistance. *African Journal of Microbiology Research*,
484 5(16), 2217-2221.
- 485 Rigobelo, E. C., Stella, A. E., Ávila, F. A., Macedo, C. & Marin, J. M. (2006).
486 Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their

- 487 processing at an abattoir in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 110,
488 194-198.
- 489 Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldán, C. D., Balbi, L., Garcãa, B., Fiorilli, G., Sosa-
490 Estani, S., Kincaid, J., Rangel, J., Griffin, P. M. (2006). Characterization and
491 epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from
492 hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens and*
493 *Disease*, 3(1), 88-96.
- 494 Roça, R. O. (2004). Microbiologia da carne. Laboratório de Tecnologia dos Produtos de
495 Origem Animal- F.C.A – UNESP – Campus de Botucatu-SP. Disponível em < [http://](http://dgta.fca.unesp.br/docentes/roca/carnes/Roca106.pdf)
496 dgta.fca.unesp.br/docentes/roca/carnes/Roca106.pdf > Acesso em: 30/08/16.
- 497 Roça, R. O., Serrano, A. M. (1994). Operações de abate de bovinos. *Higiene Alimentar*, 8(34),
498 14-20.
- 499 Schroeder, C. M., Zhao, C., Debroy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D. G., Wagner, D. D.,
500 Mcdermott, P. F. R., Walker, D. & Meng, J. (2002). Antimicrobial Resistance of
501 *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. *Applied and*
502 *Environmental Microbiology*, 68(2) 576-581.
- 503 Silva, N. (2010). Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4ed.
504 São Paulo. Livraria Varela, 632p.
- 505 Silva, N., Silveira, N. F. A., Contreras, C & Beraquet N. J. (2001). Ocorrência de *Escherichia*
506 *coli* O157:H7 em produtos cárneos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 21(2), 223-227.
- 507 Silva, F. F. P., Santos, M. A. A. & Schmidt, V. (2008). Resistência a antimicrobianos de
508 *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. *Arquivo Brasileiro de*
509 *Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60, 762-765.

- 510 Sofos, J. N., Kochevar, S. L., Reagan, J. O., Smith, G. C. (1999). Incidence of *Salmonella* on
511 beef carcasses relating to the U.S Meat and Poultry Inspection Regulations. *Journal of*
512 *Food Protection*, 62(5), 467-473.
- 513 Stephan, R. & Schumacher, S. (2001). Resistance patterns of non-O157 Shiga toxinproducing
514 *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human
515 carriers in Switzerland. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 114-117.
- 516 Strockbine, N. A., Jackson, M. P., Sung, L. M., Holmes, R. K., O'brien, A. D. (1988).
517 Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type1.
518 *Journal of Bacteriology*, 170, 1116–1122.
- 519 Sumner, J., Petrenas, E., Dean, P., Dowsett, P., West, G., Wiering, R. & Raven, G. (2003).
520 Microbial contamination on beef and sheep carcasses in South Australia. *International*
521 *Journal of Food Microbiology*, 81, 255-260.
- 522 Yalçın, S., Nizamlioglu, M. & Gürbüz, U. (2001). Fecal coliform contamination of beef
523 carcasses during the slaughtering process. *Journal of Food Safety*, 21(4), 225-231.

524

525 **Agradecimentos**

526 Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado
527 de Mato Grosso do Sul (Fundect) (processo 23/200.479/2014), Universidade Católica Dom
528 Bosco e Embrapa (processo 03.14.00.047.00.00).

529

ARTIGO 3

Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas

Artigo submetido:
Pesquisa Veterinária Brasileira

Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas

Daniele Bier^{2,3}, Tayná Lemos de Oliveira³, Juliane Francielle Tutija³, Taynara Nunes Pasquatti³, Flávio Ribeiro de Araújo⁴, Newton Valério Verbisck^{4,*}

ABSTRACT.- Bier D., Oliveira, T. L., Tutija, J. F., Pasquatti, T. N., Araújo, F. R., Verbisck, N. V. 2016. [MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from beef carcasses.] Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia nº 830, Zona Rural, 79106-550, Campo Grande, MS, Brazil. E-mail: flabio.araujo@embrapa.br.

The aim of this study was to introduce matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry to improve the traditional microbiological method for the detection of *Salmonella* spp. and *E. coli* in beef carcasses from slaughterhouses exporters of Mato Grosso do Sul. 270 samples from 90 beef carcasses were evaluated in three slaughterhouses located in the State of Mato Grosso do Sul. For *Salmonella* spp. and *E. coli* isolation, the methodologies described in ISO 6579: 2002 and in the Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (2001) were used, respectively. MALDI-TOF analysis were performed on tryptone soya broth suspension isolates or directly from nutrient agar colonies, from the positive, inconclusive or negative biochemically tested samples for *Salmonella* and *E. coli*. Mass profiles were acquired on an Autoflex III SmartBeam MALDI-TOF mass spectrometer and the raw spectra were processed using the MALDI Biotyper software (Bruker Daltonics). According to the preliminary identification based on colony morphology and the biochemical reactions, seven isolates were positive for *Salmonella* spp. By MALDI Biotyper these seven isolates were also classified as belonging to the genus *Salmonella* and further identified as *S. enterica*. Four isolates showing unusual phenotypic characteristics and inconclusive results in biochemical tests for *Salmonella* were identified as belonging to *Citrobacter* and *Proteus* genera after MALDI analysis. Regarding *Escherichia coli*, 37 were positive for species biochemical testing which MALDI Biotyper confirmed. MALDI-TOF methodology allowed rapid *Salmonella* spp. and *E. coli* identity confirmation and can be used to detect these microorganisms within bacterial isolates from beef carcasses.

INDEX TERMS: beef carcasses, slaughterhouse, enterobacteria, *Salmonella*, *Escherichia coli*, MALDI-TOF.

¹Recebido em

Aceito para publicação em

² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Senador Felinto Muller, 2443, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil;

³Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brasil.

⁴Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia nº 830, Zona Rural, 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil. *Autor de correspondência: newton.verbisck@embrapa.br

RESUMO.- O objetivo deste trabalho foi introduzir a técnica de espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massas do tipo tempo-de-voou (MALDI-TOF) para incrementar o método tradicional microbiológico na detecção de *Salmonella* spp. e *E. coli* em carcaças bovinas de abatedouros-frigoríficos exportadores de Mato Grosso do Sul. Foram avaliadas 270 amostras de 90 carcaças de bovinos em três abatedouros-frigoríficos, localizados no Estado de Mato Grosso do Sul. Para isolamento de *Salmonella* spp. e *E. coli*, foram utilizadas, respectivamente, as metodologias descritas no ISO 6579:2002 e no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (2001). As análises por MALDI-TOF foram realizadas com isolados de suspensões em caldo triptona de soja ou diretamente dos cultivos em ágar nutriente, provenientes das amostras com características bioquímicas positivas, inconclusivas e negativas para *Salmonella* spp. e bioquímicas positivas e negativas para *E. coli*. Os perfis de massas foram adquiridos com o espectrômetro de massas MALDI-TOF Autoflex III SmartBeam e os espectros brutos foram processados usando o programa computacional MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). De acordo com a identificação preliminar, com base na morfologia das colônias e nas reações bioquímicas, sete isolados foram considerados positivos para *Salmonella* spp. Através do MALDI Biotyper, esses sete isolados foram classificados como pertencentes ao gênero *Salmonella* e, além disso, identificados como *S. enterica*. Quatro isolados que apresentaram características fenotípicas não usuais e resultados inconclusivos nos testes bioquímicos para *Salmonella* foram identificados como pertencentes aos gêneros *Citrobacter* e *Proteus* após análise por MALDI. Para *Escherichia coli*, 37 amostras foram positivas pelos testes bioquímicos da espécie, o que foi confirmado por MALDI Biotyper. A metodologia MALDI-TOF permitiu a rápida confirmação da identidade de *Salmonella* spp. e *E. coli* e pode ser utilizado para detecção desses microrganismos em isolados bacterianos de carcaças bovinas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: carcaças bovinas, abatedouro-frigorífico, enterobactérias, *Salmonella*, *Escherichia coli*, MALDI-TOF.

INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo e está nessa liderança desde 2008. Mesmo com o expressivo consumo de carne bovina no mercado interno, 37,4 kg per capita (Brasil 2012), as análises do governo para este segmento abordam, principalmente, os problemas a serem enfrentados em relação ao aumento das exportações, demonstrando as demandas sanitárias como condicionantes no desenvolvimento da pecuária no Brasil. Diversos patógenos podem estar presentes na carne bovina e esta ser fonte de enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs).

Todos os animais podem ser portadores de bactérias patogênicas em seu trato intestinal. Durante o abate, os animais podem ter suas carcaças contaminadas e veicularem esses microrganismos nos cortes das carnes ou nos produtos processados derivados. A contaminação pode ocorrer a partir de bactérias presentes na carcaça externa, a partir do trato intestinal ou linfonodos do animal abatido, durante as etapas de abate, transporte, armazenamento e distribuição da carne, além da manipulação humana sem condições higiênicas (Jay 2000, Borch & Arinder 2002).

Enquanto a maioria das bactérias é inofensiva e causa apenas deterioração do alimento, bactérias patogênicas como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* podem também estar presentes. Esses patógenos são associados com surtos relacionados ao

consumo de carne, causando doenças humanas e mortes em todo o mundo (Rhoades et al. 2009).

Os métodos convencionais de detecção dessas bactérias em alimentos são ainda considerados como oficiais em diversos países (APHA 1992, Meng et al. 2001, ISO 2002, FDA 2014) e no Brasil (Brasil 2003). Essas metodologias oficiais pelo método microbiológico tradicional envolvem etapas de cultura onerosas e bastante trabalhosas, necessitando de até sete dias para a confirmação dos resultados. Além disso, são propensas a erros (Marin et al. 2006, Carrique-Mas & Davies 2008).

Para a detecção de *Salmonella* e *E. coli* verotoxigênica pela metodologia tradicional, são necessárias as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo diferencial e confirmação bioquímica e sorológica. Essas etapas servem para aumentar a recuperação das células nos alimentos que possuem microbiota competitiva, células em número reduzido ou injuriadas (Bager & Petersen 1991, Rall et al. 2005).

Os testes bioquímicos permitem a identificação a partir do perfil metabólico do isolado. Porém, de acordo com Marin et al. (2006) as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas, e quando são, podem ser de difícil interpretação e classificação. Além disso, existe a possibilidade de reações falso-negativas devido à ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, além do risco de interpretações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes. Por outro lado, o aumento do número de testes bioquímicos implica no acréscimo significativo do custo da análise (Farber et al. 2001, Marin et al. 2006, Settanni e Corsetti 2007).

Métodos de diagnóstico rápidos são necessários em indústria de alimentos, principalmente de origem animal, que geralmente contém uma vida de prateleira curta, visando diminuir a perda econômica com alimentos retidos e recolhidos.

Atualmente, países importadores estão impondo restrições a mercados que não realizam controle e diagnóstico efetivo de *Salmonella* e *E. coli* verotoxigênica em carcaças bovinas. E, por isso, a detecção rápida e direta dessas enterobactérias em carcaças bovinas é uma demanda do sistema oficial de defesa, que já vem solicitando, com instituições governamentais, novas tecnologias de controle.

Diversos métodos rápidos para detecção de *Salmonella* e *E. coli* são comercialmente disponíveis e podem ser divididos em várias categorias, como procedimentos convencionais adaptados ou modificados, ensaios baseados em imunologia e ensaios baseados em ácidos nucleicos. Destes métodos, ELISA e PCR mostram especificidade e sensibilidade comparável aos métodos convencionais. A sensibilidade e especificidade destes métodos dependem em grande parte da microflora do fundo, matriz da amostra, presença de células não cultiváveis, e substâncias inibidoras como gorduras, proteínas, polissacarídeos, metais pesados, antibióticos, e compostos orgânicos (Lee et al. 2015).

A IN 62 de 26 de agosto de 2003 - MAPA, que determina os métodos oficiais para análise microbiológica de alimentos de origem animal e água, refere que métodos moleculares podem ser utilizados para identificação de *Salmonella* spp. Porém, essa IN não descreve esses métodos, indicando-os apenas quando os testes convencionais apresentarem resultados duvidosos (Brasil 2003).

Um grande avanço na detecção rápida de patógenos em alimentos pode ser o uso de estudos proteômicos, por meio da utilização da espectrometria de massas para caracterizar o microrganismo característico. A técnica de espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI (*Matrix Assisted*

Laser Desorption/Ionization) e analisador de massas do tipo tempo-de-voe – TOF (Time-Of-Flight) permite a comparação do espectro de massas de um microrganismo isolado com os espectros de referência de cepas conhecidas, podendo proporcionar a classificação e identificação do patógeno com mais rapidez do que os métodos convencionais (Siuzdak 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi introduzir a técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF para incrementar o método tradicional microbiológico na detecção de *Salmonella* spp. e *E. coli* em carcaças bovinas de abatedouros-frigoríficos exportadores de Mato Grosso do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. Foram coletadas, pelo método não destrutivo, amostras de 90 carcaças de bovinos em três abatedouros-frigoríficos, localizados no Estado de Mato Grosso do Sul, que funcionam sob Inspeção Federal. Para a coleta das amostras foram utilizadas esponjas esterilizadas (*Speci-Sponge*® - Nasco, EUA) hidratadas com 10 mL de Água Peptonada Tamponada 1% (APT 1%).

Cepas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CRMVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, foram utilizadas como controles negativos e positivos: *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922 – Biotipo I, genérica), *Escherichia coli* INCQS 00171 (CDC EDL-933 - Verotoxigênica), *Escherichia coli* NEWPROV® (ATCC 25922), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis INCQS 00258 (ATCC 13076) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium NEWPROV® (ATCC 14028).

Isolamento bacteriano. A cada bolsa plástica contendo as esponjas foram adicionados 200 mL de APT 1%, e a mistura homogeneizada com auxílio de um homogeneizador de amostras (tipo Stomacher) por 60 segundos e colocadas em frascos de Erlenmeyer, sendo esta a amostra inicial. Esses frascos foram incubados a 37 ± 1 °C por 18 ± 2 h. Para detecção de *Salmonella* spp., foi utilizada a metodologia descrita no *International Organization for Standardization (ISO 6579:2002)*, com modificações, adicionando as provas bioquímicas de motilidade, produção de H₂S, vermelho de metila e citrato.

Para a detecção de *E. coli* a metodologia utilizada foi a descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 2001 (Meng et al., 2001). As colônias suspeitas de *E. coli* em ágar MacConkey Sorbitol (SMAC) foram isoladas em ágar nutriente, incubadas a 35 ± 1 °C por 18 a 24 h, e submetidas às provas bioquímicas complementares, composto pelas provas de indol, ureia, motilidade, produção de H₂S, vermelho de metila, Voges-Proskauer, fermentação de carboidratos (*Triple Sugar Iron*) e citrato.

Preparação de amostra para MALDI-TOF. As amostras foram preparadas a partir das colônias isoladas, pelo protocolo de extração com etanol/ácido fórmico, descrito por Sauer et al. (2008) e revisto por Freiwald & Sauer (2009). Foram pipetados duzentos microlitros do caldo de cultura, que foram lavados duas vezes, por centrifugação a 16000 g durante 1 min, com água Milli-Q (Merck Millipore) estéril. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi cuidadosamente misturado em 300 µL de água Milli-Q estéril para ressuspensão das bactérias, que foram inativadas com a adição de 900 µL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich). Após centrifugação a 16000 g durante 2 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi seco ao ar à temperatura ambiente durante 10 min. As proteínas celulares foram extraídas adicionando-se ao sedimento o volume de 10 µL de ácido fórmico a 70% (Sigma-Aldrich)

e, após homogeneização, adição de 10 μ L de acetonitrila pura (Sigma-Aldrich) à mistura. Após nova centrifugação a 16000 *g* durante 2 min aplicou-se 1 μ L do sobrenadante em poço da placa de MALDI (Bruker Daltonics), deixando-se secar ao ar ambiente. Cada amostra foi coberta com 1 μ L da matriz de MALDI ácido α -ciano-4-hidróxicinâmico (Sigma-Aldrich), na concentração de 5mg/mL em solução contendo 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoracético (v/v), e subsequente secagem ao ar.

MALDI-TOF. As medições foram realizadas em um espectrômetro de massas Autoflex III SmartBeam MALDI-TOF (Bruker Daltonics) equipado com um laser de 200 Hz. Os espectros de massas foram registrados no modo linear positivo na faixa de massa de 2.000 a 20.000 Da. Os parâmetros do aparelho utilizados foram: tensão da fonte IS1 20kV, tensão da fonte IS2 de 18,55 kV, tensão de lentes 8,80 kV e tempo de retardo de extração de íons de 240 ns. Para cada espectro 200 disparos de laser foram coletados na taxa de amostragem de 0,5 GS/s. Dez espectros, a partir de diferentes posições da amostra, foram somados e processados pelo algoritmo de detecção de pico tipo centróide. Os espectros foram calibrados externamente utilizando a mistura de calibração padrão Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics).

Análises por MALDI Biotyper. Os espectros brutos foram processados usando o programa MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics) com as configurações padrões. O programa realiza normalização, suavização, subtração da linha de base e colheita de picos, criando uma lista dos picos mais significativos do espectro (valores m/z com uma determinada intensidade, com a relação sinal/ruído de 3, o limiar definido para um mínimo de 0,1 % do pico mais alto e um máximo de 100 picos). Para identificar bactérias desconhecidas, cada lista de picos gerada é comparada diretamente com a biblioteca de referência integrada (IVD, *In Vitro Diagnostic System* - Bruker Daltonics), por meio do algoritmo Biotyper, que realiza a correspondência de padrões de picos e atribui os escores de classificação usando a posição, as distribuições de intensidade e a frequência de pico, sem qualquer intervenção do utilizador. A biblioteca IVD contém informação de 3.476 espécies, incluindo 16 cepas de *Salmonella* e 11 de *E. coli*. As análises por Biotyper são classificadas utilizando os valores de escore propostos pelo fabricante: uma pontuação entre 2,300 e 3,000 indica a identificação confiável de espécie; uma pontuação entre 2,000 e 2,299 indica a identificação confiável de gênero e provável identificação de espécie, uma pontuação entre 1,700 e 1,999 indica provável identificação de gênero e uma pontuação abaixo de 1,700 indica que não há identificação confiável.

Foram incluídas na biblioteca IVD os espectros de referência (MSP, do inglês: *Main Spectra Projections*) das cinco cepas controle citadas anteriormente, contendo informação sobre as médias das massas e médias das intensidades de medições de 32 replicatas, de modo que um espectro principal exibiu os picos mais reprodutíveis típicos para cada uma daquelas cepas bacterianas. Para criar as listas de picos, o programa BioTyper foi usado como descrito acima, sendo que os 70 picos independentes com frequência de, pelo menos, 50% foram utilizados para a geração dos MSP. Os dendrogramas foram construídos com o programa estatístico Matlab 7.1 (Math-Works Inc.) integrado ao programa MALDI Biotyper 3.1 com os parâmetros de medida de distância por correlação e ligação por média normalizada entre a distância 0 (concordância total) e 1000 (sem concordância).

RESULTADOS

Neste estudo foi possível identificar com precisão todos os controles ATCC depositados na biblioteca disponível, constatando a aptidão da técnica de MALDI-TOF

em identificar corretamente *Salmonella* e *E. coli*. Além disso, foram escolhidas aleatoriamente, a partir das 270 amostras, 85 isolados com perfis bioquímicos não compatíveis com *Salmonella* spp. ou *E. coli*. Esses 85 isolados foram identificados como outros gêneros bacterianos (*Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Proteus* e *Providencia*) após análise por MALDI Biotyper.

Com base na morfologia da colônia e nas reações bioquímicas, das 270 amostras coletadas de 90 carcaças em três abatedouros-frigoríficos, 7 isolados foram positivos para *Salmonella*. Além disso, 4 isolados, das 270 amostras, apresentaram reações duvidosas em dois testes bioquímicos, sendo consideradas inconclusivas para *Salmonella*.

Buscando a confirmação do gênero e a eventual identificação de espécie para *Salmonella*, os sete isolados bioquimicamente positivos para *Salmonella* spp., foram confrontados com a biblioteca IVD. Nessa análise foi possível discriminar 3476 espécies de bactérias, entre as quais 16 sorotipos de *Salmonella*, além das duas cepas *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* da ATCC adicionais, cultivados e isolados em paralelo neste trabalho para controle das provas bioquímicas. As análises pelo programa MALDI Biotyper, feitas em triplicata, confirmaram a identificação do gênero *Salmonella* e ainda possibilitaram a classificação dos 7 isolados como sendo da espécie *S. enterica* (Quadro 1). Além disso, esses resultados revelaram que 6 dos 7 isolados apresentaram maior escore de identificação para a cepa de referência *S. Enteritidis*, enquanto que apenas o isolado 67 apresentou maior similaridade com a cepa de referência *S. Choleraesuis*. Utilizando-se as ferramentas integradas do pacote computacional MALDI Biotyper 3.1, construiu-se um dendrograma para ilustrar a semelhança molecular dos isolados frente às cepas de referência testadas, indicando uma estreita proximidade entre os isolados e a cepa de referência de *Salmonella* Enteritidis (Fig. 1).

Os quatro isolados que apresentaram resultados inconclusivos nos testes bioquímicos para *Salmonella*, por apresentarem características fenotípicas não usuais, também foram analisados por MALDI Biotyper, tendo sido identificados como pertencentes aos gêneros *Citrobacter* e *Proteus* (Quadro 2), conforme ilustrado pelos espectros de massas na figura 2. No entanto, os escores observados para esses isolados ficaram abaixo de 2,300, o que não permitiu identificar a espécie, provavelmente pela ausência na biblioteca das cepas de referência correspondentes a esses isolados. É possível ainda que esses isolados não tenham sido cultivados nas condições específicas, uma vez que o cultivo foi direcionado para o isolamento do gênero *Salmonella*.

Em relação à análise para *Escherichia coli*, das 270 amostras coletadas provenientes das 90 carcaças, 37 foram positivas pelos testes bioquímicos para essa espécie. A análise por MALDI Biotyper mostrou que, conforme esperado, todos os isolados foram classificados no gênero *Escherichia*, enquanto que, para a identificação de espécie, 30 dos 37 isolados foram confirmados, ou seja, 81,1% dos casos (Quadro 3). Nos sete isolados de campo em que a espécie não foi confirmada, os dez melhores correspondentes apresentaram escores entre 2,000 e 2,299 (dados não mostrados) indicando que esses isolados sejam espécies ou sorotipos não presentes na biblioteca disponível.

DISCUSSÃO

A espectrometria de massas MALDI-TOF tem sido utilizada com sucesso para a identificação de uma grande variedade de espécies bacterianas (Conway et al. 2001, Clark et al., 2013, Schulthess et al. 2016). O espectro de massas gerado fornece um perfil proteômico do microrganismo desconhecido, tal como uma "impressão digital". Esses

perfis são únicos para cada espécie de microrganismo, sendo possível inclusive distinguir picos específicos para os gêneros e espécies. No caso da análise por MALDI Biotyper, cada perfil pode ser automaticamente comparado a uma biblioteca de espectros de referência, gerando um *ranking* numérico com a lista dos microrganismos mais estreitamente relacionado. Esse *ranking* indica o nível de confiança na identificação e, dependendo de quão elevado é o valor, o organismo é identificado no nível de gênero ou espécie (Patel 2013). Quando os espectros adquiridos para uma determinada amostra ou isolado não são identificados na biblioteca disponível, é possível gerar os correspondentes espectros de referência e incluí-los ao banco de dados, sendo o operador responsável pelo fornecimento ao sistema das informações precisas quanto à origem e referência daquele microrganismo. Assim, o programa MALDI Biotyper permite a inclusão de espectros de referência diferentes daqueles fornecidos pelo fabricante (Pignone et al. 2006, El Khéchine et al. 2011). Neste estudo foi possível identificar com precisão todos os controles ATCC depositados na biblioteca disponível, constatando a aptidão da técnica de MALDI-TOF em identificar corretamente *Salmonella* e *E. coli*.

Nas análises realizadas por este trabalho, todos os isolados bioquimicamente positivos para *Salmonella* spp. foram também identificados por MALDI Biotyper como pertencentes ao gênero *Salmonella*, enquanto que os isolados com perfis bioquímicos não compatíveis com *Salmonella* spp. foram identificados como outros gêneros bacterianos. De acordo com os valores de escore obtidos, as amostras de *Salmonella* foram 100% correlacionadas ao nível de gênero e identificadas como sendo da espécie *S. enterica*. Diversas investigações também relatam identificação de aproximadamente 100% de alguns microrganismos, tais como *Neisseria* spp. (Irina et al. 2009), *Clostridium* spp. (Grosse-Herrenthey et al. 2008) e *Mycobacterium* spp. (Pignone et al. 2006).

Todos os isolados foram classificados como *S. enterica*, porém, seis dos sete isolados apresentaram maior escore de identificação para a cepa de referência *S. Enteritidis*, enquanto que apenas um isolado apresentou maior similaridade com a cepa de referência *S. Choleraesuis*. Com os dados obtidos não foi possível determinar os sorovares das amostras, o que talvez possa ser alcançado com maior quantidade de informação estrutural, por exemplo, através do sequenciamento de peptídeos dos perfis protéicos encontrados (Fagerquist et al. 2010, Hart et al. 2015).

Para quatro isolados a identificação bioquímica, após as etapas do cultivo tradicional, de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e plaqueamento diferencial, foi inconclusiva. Esses isolados foram submetidos a testes moleculares, confirmando-se não se tratarem do gênero *Salmonella* (dados não mostrados/publicados à parte). Os testes bioquímicos identificam as salmonelas por seus perfis fenotípicos, porém, essas propriedades fenotípicas podem não ser expressas ou apresentar variabilidade devido à ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, podendo levar a reações falso-negativas, ou ser de difícil ou errônea interpretação (Farber et al. 2001, Marin et al. 2006, Settanni e Corsetti 2007). De fato, esses quatro isolados foram submetidos a análise por MALDI Biotyper e foram identificados como pertencentes aos gêneros bacterianos *Citrobacter* e *Proteus*. Esses resultados também reforçam a aptidão e demonstram a acurácia da técnica, pois, os isolados de *Citrobacter* e *Proteus* podem apresentar biotipos atípicos que apresentam características de cultivo, bioquímicas e antigênicas que se assemelham às do gênero *Salmonella* (Gilchrist 1995).

Na análise por MALDI Biotyper para os isolados de *E. coli*, sete não tiveram a espécie confirmada, por apresentarem escores entre 2,000 e 2,299, provavelmente porque as espécies ou sorotipos correspondentes a esses isolados não estão presentes

na biblioteca IVD do programa Biotyper. Além disso, esse resultado sugere que 19.9% dos isolados identificados bioquimicamente como *E. coli* podem tratar-se de outras espécies. Vários estudos que avaliaram o desempenho de MALDI-TOF MS para a identificação de microrganismos demonstraram que estes sistemas são altamente descritivos, precisos e reprodutíveis. Esses trabalhos comparam a espectrometria de massas com outras ferramentas já utilizadas na identificação de microrganismos, como os testes bioquímicos automatizados e os tradicionais de cultivo e demonstram acurácias entre 98 e 99% para as espécies analisadas (Eigner et al. 2009, Seng et al. 2009, Cherkaoui et al. 2010, Van Veen et al. 2010), comprovando a confiabilidade dos bancos de dados comercialmente disponíveis Biotyper (Bruker Daltonics) e SARAMIS (Shimadzu Corporation). Nagy et al. (2009), trabalhando com espécies de *Bacterioides*, relataram que o poder de discriminação e identificação por MALDI-TOF foi superior aos testes bioquímicos. Eigner et al. (2009), ao analisarem 1116 isolados clínicos comparando MALDI Biotyper com a identificação bioquímica convencional, demonstraram 95,2% de consistência na identificação de espécies bacterianas.

A identificação por meio do perfil proteico da bactéria ao invés de diferenciações físicas, metabólicas ou bioquímicas é uma das principais vantagens da espectrometria de massas MALDI-TOF. Por isso, essa técnica tem sido cada vez mais aplicada no diagnóstico microbiológico, tendo até substituído os métodos bioquímicos convencionais em alguns laboratórios no mundo. Neste trabalho, as amostras positivas para *Salmonella* e *E. coli* identificadas pela microbiologia tradicional foram confirmadas pelo MALDI-TOF, bem como nos isolados com perfis bioquímicos não compatíveis com *Salmonella* spp. ou *E. coli*, que foram identificados como outros gêneros bacterianos após MALDI Biotyper. Esses resultados permitem sugerir a utilização dessa técnica em substituição às provas bioquímicas de identificação, uma vez que apresentou a mesma especificidade nos resultados, porém, sendo de mais fácil execução e menos suscetível a erros de interpretação, como ocorreu com as amostras inconclusivas na identificação bioquímica.

Em um estudo realizado por Cherkaoui et al. (2010), analisando 720 amostras clínicas para comparar dois métodos de espectrometria de massas MALDI-TOF (Microflex LT e Axima Assurance) com a identificação convencional bacteriana, os autores concluíram que, se MALDI-TOF tivesse sido aplicado como teste inicial e a identificação bioquímica tivesse sido aplicada apenas quando não havia identificação por MALDI, o laboratório teria economizado cerca de US\$ 5,00 por isolado e o tempo para a liberação do resultado teria sido reduzido para aproximadamente 8 horas (Cherkaoui et al. 2010).

Além de despendar menos trabalho, a identificação usando MALDI-TOF pode analisar amostras rapidamente dentro de minutos após a positividade da cultura. De acordo com Panda et al. (2014) o procedimento de extração para uma única amostra leva 23 minutos e o tempo de processamento quando feito com várias amostras é reduzido (aproximadamente 3h para 82 amostras), facilitando o resultado e aumentando o rendimento. Ao contrário da identificação por meio de métodos bioquímicos convencionais, que são processos demorados e requerem de 24 a 48 h após a positividade da cultura, podendo atrasar, por exemplo, as intervenções terapêuticas. Além disso, o processo de extração de proteínas para análise por MALDI-TOF é simples, de relativo baixo custo e não necessita de conhecimentos técnicos de alta complexidade, tornando-se uma vantagem sobre os outros métodos de identificação (Panda et al. 2014).

Dessa mesma forma, de acordo com Tan et al. (2012), que também comparou MALDI-TOF com os métodos convencionais, o tempo de rotação para a identificação de bactérias e fungos melhora em média 1,45 dias. Além disso, apenas uma pequena quantidade de organismo é necessária, então, os testes podem ser executados diretamente a partir de colônias isoladas em placas de cultura primárias, enquanto que outros métodos podem requerer outros cultivos (Patel 2013).

A indústria de carnes é um dos principais setores de alimentos no Brasil. A carne bovina é um dos alimentos mais importantes da dieta da população brasileira, além de apresentar um dos maiores potenciais de crescimento e possuir um alto impacto na economia do País. O uso de MALDI-TOF confere maior precisão, com relativa rapidez e baixo custo, na identificação dos patógenos presentes nas amostras de carcaças. Isso é de enorme relevância, uma vez que, os alimentos de origem animal, geralmente possuem uma vida de prateleira curta. Dessa forma, a identificação precisa e rápida de patógenos pode diminuir a perda econômica com alimentos retidos e recolhidos, além de implicar em uma melhor qualidade da carne bovina, reduzindo os riscos de infecções humanas de origem alimentar.

CONCLUSÃO

A metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF permite a rápida confirmação da identidade de *Salmonella* spp. e *E. coli*, a partir dos isolados em meios diferenciais, representando um avanço na precisão de identificação de microrganismos patogênicos. Essa técnica pode ser utilizada como rotina para identificação de patógenos após isolamento por cultivo de amostras coletadas de abatedouros-frigoríficos.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) (processo 23/200.479/2014) e Embrapa (projetos 03.14.00.047.00.00 e 03.13.10.008.00.00).

REFERÊNCIAS

APHA - American Public Health Association. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Chapter 25: *Salmonella*. 3.ed. Washington, p. 371-422.

Bager F. & Petersen J. 1991. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. Acta Vet. Scand. 32: 473-481.

Borch E. & Arinder P. 2002. Bacteriological safety issues in red meat and ready-treat meat products, as well as control measures. Meat Sci. 62(3): 381- 390.

Brasil. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, 18/09/2003, Seção 1, p.14, 2003.

Brasil. 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Animal: Mercado Interno. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>>. Acesso em: 16 ago. 2016.

Grosse-Herrenthey A., Maier T., Gessler F., Schaumann R., Böhnel H., Kostrzewa M. & Krüger M. 2008. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization – time of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe*, 14(4): 242-9.

Hart P., Wey E., McHugh T.D, Balakrishnan I. & Belgacem O. 2015. A method for the detection of antibiotic resistance markers in clinical strains of *Escherichia coli* using MALDI mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 111: 1-8.

Irina E.N., Borovskaya A.D., Malakhova M.M., Vereshchagin V.A., Kubanova A.A., Kruglov A.N. & Govorun V.M. 2009. Direct Bacterial Profiling by Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Identification of Pathogenic *Neisseria*. *J. Mol. Diagn.* 11(1): 75–86.

International Organization for Standardization. 2002. ISO 6579:2002: microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Switzerland: ISO:2002. 20p.

Jay J.M. 2000. Fresh meats and poultry. In J. M. Jay (Ed.), *Modern food microbiology*: Aspen Publishers, Inc, p. 59–85.

Lee K.M., Runyon M., Herrman T.J., Phillips R. & Hsieh J. 2015. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47: 264-276.

Marin V.A., Lemos A.A. & Freitas E.I. 2006. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. *Rev. Hig. Alim.* 20(145): 46-50.

Meng J.H., Feng P. & Doyle M.P. 2001. Pathogenic *Escherichia coli*. In DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4.ed. Washington: American Public Health Association, cap.35, p.331-342.

Nagy E.T., Maier E., Urban G. Terhes & M. Kostrzewa. 2009. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microb. Infec.* 15:796–802.

Panda A., Kurapati S., Samantaray J.C., Srinivasan A. & Khalil S. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic based identification of clinical bacterial isolates. *Indian J. Med. Res.* 140: 770-777.

Patel R. 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. *Clin. Infect. Dis.* 57(4): 564-72.

Pignone M. Greth K.M., Cooper J., Emerson D. & Tangi J. 2006. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 44(6): 1963-70.

Rall V. L. M., Rall R., Aragon L. C. & Silva M. G. 2005. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. *Braz. J. Microb.* 36(2): 147-150.

Rhoades J.R., Duffy G. & Koutsoumanis K. 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. *Food Microb.* 26(4): 357-376.

Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M. & Geider K. 2008. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One.* 30(7): e2843.

Schulthess B., Bloemberg G.V., Zbinden A., Mouttet F., Zbinden R., Böttger E.C. & Hombach M. 2016. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Fastidious Gram-Negative Rods. *J. Clin. Microb.* 54(3): 543-8.

Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P.E., Rolain J.M. & Raoult D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49: 543-51.

Settanni L. & Corsetti A. 2007. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food and beverage-associated microorganisms: a review. *J. Microb. Methods.* 69(1): 1-22.

Siuzdak G. 2006. The expanding role of mass spectrometry in biotechnology. 2.ed. San Diego: MCC Press, 257p. Disponível em: <https://masspec.scripps.edu/book_toc.php>. Acesso em 16 ago. 2016.

Tan K.E., Ellis B.C., Lee R., Stamper P.D., Zhang S.X. & Carroll KC. 2012. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J. Clin. Microb.* 50: 3301-8.

Teramoto K., Sato H., Sun L., Torimura M., Tao H., Yoshikawa H., Hotta Y., Hosoda A. & Tamura H. 2007. Phylogenetic classification of *Pseudomonas putida* strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. *Anal. Chem.* 79(22): 8712-9.

Van Veen S.Q., Claas E.C. & Kuijper E.J. 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 48: 900-7.

Legendas das Figuras

Quadro 1. Identificação por MALDI Biotyper dos isolados de carcaças bovinas positivos bioquimicamente para *Salmonella* spp.

Fig. 1. Dendrograma de isolados positivos para *Salmonella* spp. após análise por MALDI Biotyper

Quadro 2. Identificação por MALDI Biotyper dos isolados bacterianos de carcaças bovinas inconclusivos na identificação bioquímica para *Salmonella* spp.

Fig. 2. Espectros de massas MALDI-TOF dos isolados 7, 22 e 62 identificados como *Salmonella* Enteritidis, *Citrobacter* sp. e *Proteus* sp.

Quadro 3. Identificação por MALDI Biotyper 3.1 dos isolados de carcaças bovinas positivos bioquimicamente para *Escherichia coli*

Quadro 1. Identificação por MALDI Biotyper dos isolados de carcaças bovinas positivos bioquimicamente para *Salmonella* spp.

Isolado	Réplica 1	Escore	Réplica 2	Escore	Réplica 3	Escore
7	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,414	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,396	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,368
11	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,445	<i>Salmonella</i> sp (choleraesuis)*	2,363	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,348
33	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,42	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,401	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,396
38	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,477	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,449	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,365
45	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,352	<i>Salmonella</i> sp (choleraesuis)*	2,335	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,304
53	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,448	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,376	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,319
67	<i>Salmonella</i> sp (choleraesuis)*	2,316	<i>Salmonella</i> sp (choleraesuis)*	2,314	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,264

* Nomenclatura presente na biblioteca utilizada no programa Biotyper .

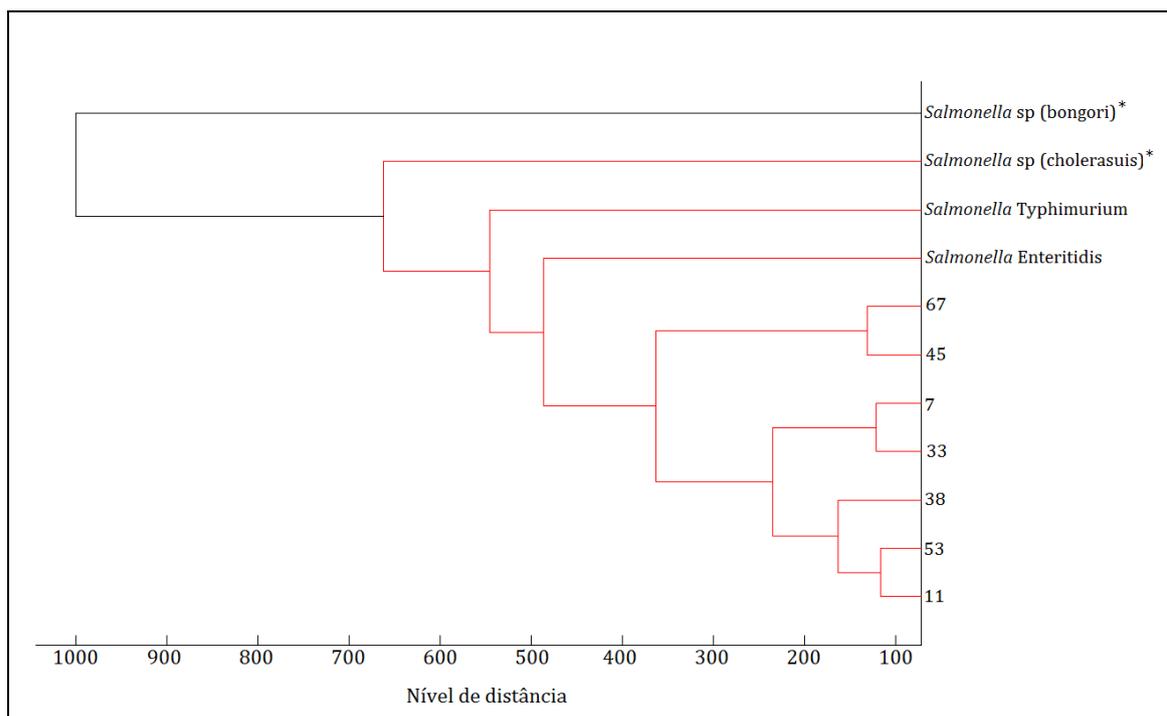


Fig. 1. Dendrograma de isolados positivos para *Salmonella* spp. após análise por MALDI Biotyper.

* Nomenclatura presente na biblioteca utilizada no programa Biotyper.

Quadro 2. Identificação por MALDI Biotyper dos isolados bacterianos de carcaças bovinas inconclusivos na identificação bioquímica para *Salmonella* spp.

Isolado	Réplica 1	Escore	Réplica 2	Escore	Réplica 3	Escore
22	<i>Citrobacter freundii</i>	2,298	<i>Citrobacter freundii</i>	2,275	<i>Citrobacter freundii</i>	2,191
31	<i>Citrobacter freundii</i>	2,174	<i>Citrobacter freundii</i>	2,08	<i>Citrobacter freundii</i>	2,027
33	<i>Citrobacter freundii</i>	2,269	<i>Citrobacter freundii</i>	2,268	<i>Citrobacter freundii</i>	2,242
62	<i>Proteus vulgaris</i>	2,196	<i>Proteus vulgaris</i>	2,172	<i>Proteus vulgaris</i>	2,05

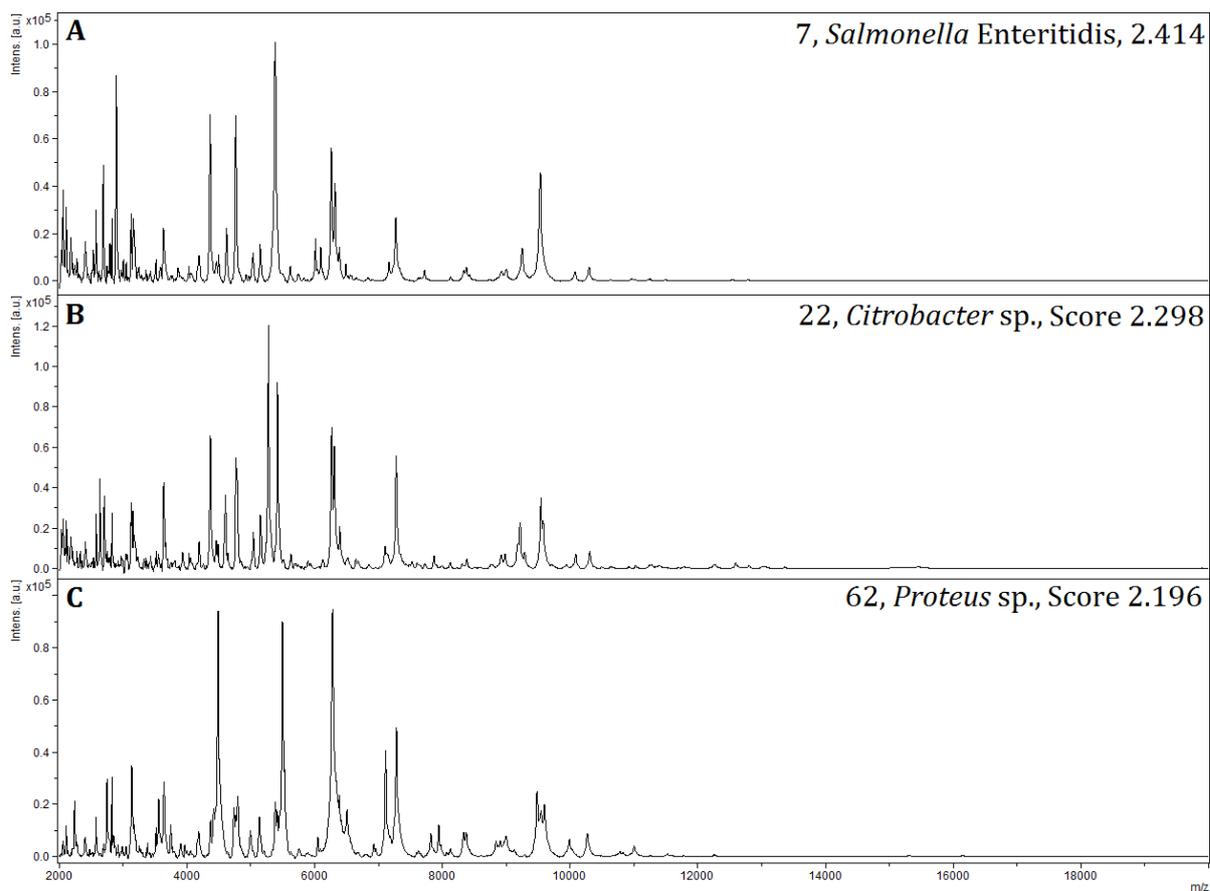


Fig. 2. Espectros de massas MALDI-TOF dos isolados 7, 22 e 62 identificados como *Salmonella Enteritidis* (A), *Citrobacter* (B) e *Proteus* (C).

Quadro 3. Identificação por MALDI Biotyper dos isolados de carcaças bovinas positivos bioquimicamente para *Escherichia coli* *.

Isolado	Réplica 1	Escore	Réplica 2	Escore	Réplica 3	Escore
1355E	<i>Escherichia</i>	2,539	<i>Escherichia coli</i>	2,505	<i>Escherichia coli</i>	2,472
1355L	<i>Escherichia</i>	2,473	<i>Escherichia coli</i>	2,468	<i>Escherichia coli</i>	2,445
1358L	<i>Escherichia</i>	2,491	<i>Escherichia coli</i>	2,477	<i>Escherichia coli</i>	2,449
247L	<i>Escherichia</i>	2,325	<i>Escherichia coli</i>	2,127	<i>Escherichia coli</i>	2,126
320E	<i>Escherichia</i>	2,5	<i>Escherichia coli</i>	2,493	<i>Escherichia coli</i>	2,464
355R	<i>Escherichia</i>	2,376	<i>Escherichia coli</i>	2,322	<i>Escherichia coli</i>	2,321
357E	<i>Escherichia</i>	2,552	<i>Escherichia coli</i>	2,442	<i>Escherichia coli</i>	2,438
363E	<i>Escherichia</i>	2,414	<i>Escherichia coli</i>	2,39	<i>Escherichia coli</i>	2,32
357R	<i>Escherichia</i>	2,418	<i>Escherichia coli</i>	2,39	<i>Escherichia coli</i>	2,17
394E	<i>Escherichia</i>	2,479	<i>Escherichia coli</i>	2,416	<i>Escherichia coli</i>	2,241
395L	<i>Escherichia</i>	2,418	<i>Escherichia coli</i>	2,113	<i>Escherichia coli</i>	2,082
398L	<i>Escherichia</i>	2,489	<i>Escherichia coli</i>	2,44	<i>Escherichia coli</i>	2,425
399E	<i>Escherichia</i>	2,435	<i>Escherichia coli</i>	2,418	<i>Escherichia coli</i>	2,399
399L	<i>Escherichia</i>	2,523	<i>Escherichia coli</i>	2,515	<i>Escherichia coli</i>	2,508
401E 2	<i>Escherichia</i>	2,527	<i>Escherichia coli</i>	2,497	<i>Escherichia coli</i>	2,449
402E 2	<i>Escherichia</i>	2,464	<i>Escherichia coli</i>	2,44	<i>Escherichia coli</i>	2,412
453E	<i>Escherichia</i>	2,369	<i>Escherichia coli</i>	2,166	<i>Escherichia coli</i>	2,139
454E	<i>Escherichia</i>	2,411	<i>Escherichia coli</i>	2,391	<i>Escherichia coli</i>	2,387
475E	<i>Escherichia</i>	2,512	<i>Escherichia coli</i>	2,478	<i>Escherichia coli</i>	2,458
476L	<i>Escherichia</i>	2,353	<i>Escherichia coli</i>	2,313	<i>Escherichia coli</i>	2,097
477L	<i>Escherichia</i>	2,373	<i>Escherichia coli</i>	2,313	<i>Escherichia coli</i>	2,306
478E	<i>Escherichia</i>	2,479	<i>Escherichia coli</i>	2,434	<i>Escherichia coli</i>	2,377
16E	<i>Escherichia</i>	2,302	<i>Escherichia coli</i>	2,256	<i>Escherichia coli</i>	2,247
17E	<i>Escherichia</i>	2,444	<i>Escherichia coli</i>	2,392	<i>Escherichia coli</i>	2,225
21E	<i>Escherichia</i>	2,333	<i>Escherichia coli</i>	2,282	<i>Escherichia coli</i>	2,281
23E	<i>Escherichia</i>	2,409	<i>Escherichia coli</i>	2,336	<i>Escherichia coli</i>	2,29
23R	<i>Escherichia</i>	2,335	<i>Escherichia coli</i>	2,294	<i>Escherichia coli</i>	2,195
6E	<i>Escherichia</i>	2,448	<i>Escherichia coli</i>	2,354	<i>Escherichia coli</i>	2,298
6L	<i>Escherichia</i>	2,44	<i>Escherichia coli</i>	2,392	<i>Escherichia coli</i>	2,387
7E	<i>Escherichia</i>	2,397	<i>Escherichia coli</i>	2,372	<i>Escherichia coli</i>	2,296

* Dos 37 isolados testados por MALDI, sete (354L, 318R, 354E, 356E, 453L, 3L, 7L) apresentaram escore entre 2,0 e 2,299 (dados não mostrados).