

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Márcia Regina Loiko
(Médica Veterinária - ULBRA)

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES E
CARACTERIZAÇÃO DE *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*
O157:H7 EM ETAPAS DO ABATE DE BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL**

Porto Alegre
2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Márcia Regina Loiko
(Médica Veterinária - ULBRA)

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES E
CARACTERIZAÇÃO DE *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*
O157:H7 EM ETAPAS DO ABATE DE BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo
Co-orientador: Prof. Dr. Milton L. P. Espírito Santo

Porto Alegre
2013

CIP - Catalogação na Publicação

Loiko, Márcia Regina

Quantificação de micro-organismos indicadores e caracterização de *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 em etapas do abate de bovinos no Rio Grande do Sul / Márcia Regina Loiko.

-- 2013.

135 f.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo.

Coorientador: Prof. Dr. Milton L.P. Espírito Santo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Carne bovina. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. *Salmonella* spp.. 4. *Escherichia coli* O157:H7. I. Tondo, Prof. Dr. Eduardo César, orient. II. Espírito Santo, Prof. Dr. Milton L.P., coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Márcia Regina Loiko
(Médica Veterinária - ULBRA)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora:

Homologada em:
Por:

EDUARDO CESAR TONDO
Orientador – PPGCTA/UFRGS

MARCO ANTÔNIO ZÁCHIA AYUB
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA)

WLADIMIR PADILHA DA SILVA
Banca – Universidade Federal de
Pelotas/UFPEL

JEVERSON FRAZZON
Banca – PPGCTA/UFRGS

CELSO PIANTA
Banca – Universidade Luterana do
Brasil/ULBRA

VITOR MANFROI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão
que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades
e às pessoas que amamos, que a vida é bela sim,
e que eu sempre dei o melhor de mim.....
e que valeu a pena!!!!

Luís Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me carregado em seus braços nos momentos que mais precisei.

Ao amor da minha vida, Tito, meu amigo, companheiro, confidente, por fazer parte da minha história, por estar presente em todos os momentos da minha vida e por sempre me apoiar, Obrigada. Ao meu cunhado, Gerson, pela ajuda e amizade.

À minha irmã Karina, pelo amor incondicional, amiga, companheira, pelo apoio, amizade, irmandade, por fazer parte da minha vida.

À Cheila de Paula, pela amizade, ajuda, pelo companheirismo nas análises, sempre quando precisei. Por fazer parte de toda a minha trajetória dentro do laboratório, me ensinando, apoiando e acima de tudo sempre acreditando no meu potencial, és uma grande amiga.

À Letícia Casarin, pela amizade sincera, apoio, ajuda nos momentos que precisei, pelas correções, mas acima de tudo, pela pessoa incrível que sempre foi comigo.

À Ana Carolina Langone, minha bolsista e amiga, que me ajudou tanto nas análises microbiológicas, esteve sempre presente nos momentos mais difíceis da pesquisa, pelo apoio, confiança e amizade.

As bolsistas do laboratório, Anelise Possamai, Fabiana Perini, por toda ajuda durante a realização das análises microbiológicas e idas ao frigorífico, sempre alegres e amigas.

A todos do laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (205), Fabiana Pacheco, Susana, Rochele Quadros, Betina Bender, Josete Baialardi que, de alguma forma, estiveram presentes e me ajudaram no período em que estive no laboratório, pela amizade e por fazerem parte dessa história.

Ao Prof. Eduardo Tondo pela orientação, ensinamentos e pela confiança em mim depositada e pela oportunidade que me deu ao abrir as portas do laboratório para que eu pudesse fazer parte da sua equipe.

Aos professores do PPGCTA pelos ensinamentos e a todos os funcionários do ICTA pela ajuda quando precisei.

Muito Obrigada!!!!

Quantificação de micro-organismos indicadores e caracterização de *Listeria spp.*, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* O157:H7 em etapas do abate de bovinos no Rio Grande do Sul

Autor: Márcia Regina Loiko

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Co-orientador: Prof. Dr. Milton L. P. Espírito Santo

RESUMO

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) constituem um grave problema de saúde pública, sendo que a prevenção dessas doenças é um grande desafio em todo o mundo. Assim como em outros países, no Brasil, as carnes e seus derivados têm sido frequentemente identificados como veículos de micro-organismos responsáveis por DTA, porém, ao mesmo tempo, a bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro. A manutenção do comércio interno e externo da carne bovina brasileira está diretamente ligada às exigências de qualidade e inocuidade. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7 e micro-organismos indicadores em diferentes etapas do abate de bovinos, em um matadouro frigorífico exportador do Rio Grande do Sul, Brasil. Além disso, objetivou-se caracterizar fenotípica e genotipicamente os micro-organismos patogênicos isolados. Para tanto, amostras de superfície de 108 animais ou carcaças foram coletadas em três pontos do processo do abate, os quais foram: Ponto 1, antes do abate, sobre o couro do animal, Ponto 2, sobre a carcaça, após a esfolagem e Ponto 3, sobre a carcaça após a lavagem, antes da refrigeração. Ao todo foram coletadas e analisadas 324 amostras. Os resultados demonstraram que 10,19% (11/108) das amostras foram positivas para *Listeria spp.*, 0,93% (1/108) positiva para *Salmonella* Livingstone e 20,37% (22/108) positivas para *E. coli* O157:H7. Os valores das contagens de mesófilos totais variaram de 1,16 a 6,40 log UFC/cm² e para *E. coli* os valores ficaram entre não detectável (ND) a 3,32 log UFC/cm². O P1 foi o ponto onde ocorreu o maior número de isolamentos dos patógenos e se obteve as maiores contagens para mesófilos totais e *E. coli*. A análise por PCR das cepas de *L. monocytogenes* identificou dois sorotipos predominantes, o sorotipo 1/2a e o sorotipo 4b além da presença do gene de virulência *hlyA* em todas as cepas avaliadas. A cepa de *S. Livingstone* foi positiva para os genes *InvA*, *SefA*, e negativo para *SpvC*. A análise por PCR multiplex dos isolados de *E. coli* O157:H7 revelou 3 perfis genotípicos, conforme a presença dos genes *stx1*, *stx2*, *eae* e *rfbO157*. Das cepas patogênicas isoladas, algumas apresentaram multirresistência frente a vários antimicrobianos testados. Todas as cepas de *Listeria* (100%) foram resistentes para ácido nalidíxico, 90,91% mostrou resistência para cefoxitina, 90,91% clindamicina, 81,82% cefalotina e 54,55% para sulfonamida. As cepas de *L. monocytogenes* 4b apresentaram resistência a oito antimicrobianos. A cepa de *S. Livingstone* apresentou resistência frente a seis antimicrobianos, ampicilina, clindamicina, cefalotina, cefoxitina, eritromicina e vancomicina. As cepas de *E. coli* O157:H7 apresentaram grande espectro de resistência, principalmente a Clindamicina (100%), ácido nalidíxico (28,57%), trimetoprim + sulfonamida (23,81%), estreptomicina (19,05%) e cloranfenicol (14,29%). A análise por PFGE das cepas de *E. coli* O157:H7 demonstrou 6 perfis de bandas, sendo que um dos perfis agrupou 14 isolados (63,64%). Duas cepas (A4P1 e A5P2), isoladas nessa pesquisa, apresentaram o mesmo perfil fenotípico e genotípico de uma cepa isolada de casos de surto na

Argentina (A13) e que foi utilizada como controle positivo neste estudo. Resultado que sugere que houve transferência de tal clone de *E. coli* O157:H7 entre os países. Uma cepa foi encontrada no P1, P2 e P3 na mesma carcaça, indicando contaminação cruzada. Reduções significativas nas contagens de micro-organismos indicadores foram observadas entre os pontos avaliados, mas houve contaminação das carcaças por patógenos, como *L. monocytogenes*, *S. Livingstone* e *E. coli* O157:H7 em todos os pontos avaliados. A adoção de um sistema de monitoramento e de prevenção prático e eficiente é fundamental para evitar casos de surtos, utilizando para isso um controle maior através das Boas Práticas de Fabricação e APPCC, evitando a contaminação e manutenção de patógenos através da cadeia de produção de carne bovina.

Palavras-chave: carne bovina, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7, genes de virulência, PFGE, PCR.

Quantification of indicator microorganisms and characterization of *Listeria* spp., *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in steps of cattle slaughter in Rio Grande do Sul state

Author: Marcia Regina Loiko

Advisor: Dr. Eduardo Cesar Tondo

Co- Advisor: Prof. Dr. Milton L. P. Espírito Santo

ABSTRACT

Foodborne Diseases (FBD) is a serious public health problem, and the prevention of these diseases is a major challenge worldwide. Like in other countries, in Brazil, meat and its derivatives have often been identified as carriers of micro-organisms responsible for FBDs; nevertheless, the beef cattle production represents the largest share of Brazilian agribusiness. The maintenance of internal and external trade of Brazilian beef is directly linked to the demands of quality and safety. The present study aimed to investigate the occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 and indicator microorganisms in different stages of cattle slaughter in an exporter slaughterhouse in the southern state of Rio Grande do Sul, Brazil. Furthermore, the objective was to characterize the phenotype and genotype of the isolated pathogenic microorganisms. Therefore, surface samples of 108 animals or carcasses were collected at three points in the process of slaughter, which were: P1, before slaughter and on the animal skin, P2, on the carcass after skinning and P3 on the carcass after washing, before refrigeration. In all, 324 samples were collected and analyzed. The results showed that 10.19 % (11/108) of samples were positive for *Listeria* spp., 0.93 % (1/108) positive for *S. Livingstone* and 20.37 % (22/108) were positive for *E. coli* O157:H7. The values of mesophilic counts ranged from 1.16 to 6.40 log CFU/cm² and *E. coli* values ranged from non-detectable (ND) to 3.32 log CFU/cm². P1 was the point where the largest number of pathogen isolates occurred and the highest scores for mesophilic and *E. coli* were obtained. PCR analysis of the strains of *Listeria monocytogenes* identified two predominant serotypes, serotype 4b and serotype 1/2a besides the presence of virulence gene *hlyA* in all strains tested. The strain of *S. Livingstone* was positive for genes *InvA*, *sefA*, and negative for *spvC*. The multiplex PCR analysis of the isolates of *E. coli* O157:H7 revealed three genotypic profiles, with the presence of genes *stx1*, *stx2*, *eae* and *rfbO157*. From the Pathogenic strains isolated, some showed multidrug resistance against several antibiotics tested. All strains of *Listeria* (100 %) were resistant to nalidixic acid, 90.91 % showed resistance to cefoxitin, 90.91 % to clindamycin, 81.82 % to cephalothin and 54.55% to sulfonamide. Strains of *Listeria monocytogenes* 4b showed resistance to eight antibiotics. The strain of *S. Livingstone* showed resistance against six antimicrobials; ampicillin, clindamycin, cephalothin, cefoxitin, erythromycin and vancomycin. The strains of *E. coli* O157:H7 exhibited broad spectrum resistance, especially to clindamycin (100 %), nalidixic acid (28.57 %), trimethoprim + sulphonomide (23.81 %), streptomycin (19.05 %) and chloramphenicol (14.29 %). PFGE analysis of strains of *E. coli* O157:H7 showed six profiles, and one of the profiles grouped 14 isolates (63.64 %). One strain was found in P1, P2 and P3 on the same carcass, indicating cross-contamination. Significant reductions in the counts of indicator micro-organisms were observed between the first point (skin) and the other points under evaluation, but the results indicated that there was contamination by pathogens such as *L. monocytogenes*, *S. Livingstone* and *E. coli* O157:H7 in all the

evaluated points. Greater control must exist through Good Manufacturing practices and HACCP to prevent contamination and maintenance through the beef production chain of pathogens of importance to public health.

Keywords: beef, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7, virulence genes, PFGE, PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

° C: Celsius
ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
AMP: ampicillin
ATCC: American Type Culture Collection
BAM: Bacteriological Analytical Manual
BPF: Boas Práticas de Fabricação
BHI: Brain Heart Infusion
BPW: Buffered Peptone Water
C: chloramphenicol
CDA-ARMPOA: Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para Avaliação de Riscos Microbiológicos em Produtos de Origem Animal
CDC: Centers for Disease Control and Preventions
cm²: centímetro quadrado
CIP: ciprofloxacina
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos
EAGGEC: *Escherichia coli* Enteroagregativa
EHEC: *E. coli* Enterohemorrágica
EIEC: *E. coli* Enteroinvasiva
EPEC: *E. coli* Enteropatogênica
ETEC: *E. coli* Enterotoxigênica
EUA: Estados Unidos da América
FDA: Food and Drugs Administration
FoodNet: Foodborne Diseases Active Surveillance Network
GEN: gentamicina
ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
IOC/FIOCRUZ: Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz
K: Kanamycin
LIA: Lysine Iron agar
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NAL: nalidixic acid
NARMS: National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria
OMS: Organização Mundial da Saúde
P1: Ponto 1
P2: Ponto 2
P3: Ponto 3
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PCR: Polymerase Chain Reaction

RS: Rio Grande do Sul

S: streptomycin

STEC: *Escherichia coli* produtora de Toxina Shiga

SHU: Síndrome Hemolítica Urêmica

SXT: sulfamethoxazole/trimethoprima

T: tetracycline

TSI: Triple Sugar Iron agar,

UFC: Unidade Formadora de Colônias

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

XLD: Xylose Lysine Deoxycholate agar

WHO: World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1:

Figure 01: Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by multiplex PCR of strains of *Listeria monocytogenes* isolated from bovine carcass. Line 1- molecular weight marker, Line 2-1/2a strain (isolated A7P1); line 3-4b strain (isolated A2P2); line 4-negative control. Letters: A-*IMO* 0737 gene (691 bp – serotype 1/2a); B- *prs* gene (370 bp – Genera *Listeria* spp.); C-*ORF* 2110 gene (597 bp – serotype 4b); D-*ORF* 2819 (471 bp – serotype 4b);

Figure 02: Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by PCR of strains of *Listeria monocytogenes* isolated from bovine carcass. M: molecular weight marker; 1, negative control; 2, *Listeria monocytogenes* (isolated A2P2). Letter: A-*hlyA* gene (702 bp).

Figure 03: Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by PCR strain of *S. Livingstone* isolated from bovine carcass. M: molecular weight marker, 1: positive control (*InvA* gene); 2: Sample *S. Livingstone* (positive), 3: negative control. Letter: A – *InvA* gene (521 bp).

Figure 04: Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by PCR strain of *S. Livingstone* isolated from bovine carcass. M: molecular weight marker, 1: positive control (gene *sefA*), 2: negative control; 3: Sample *S. Livingstone* (positive). Letter: A – *sefA* gene (310 bp).

ARTIGO 2:

Figure 1. Multiplex-PCR to *E. coli* O157:H7 virulence genes. Lanes 1 to 3: 13, 15 and 19 isolates; lane 4: control strain C2 (*E. coli* O157: H7-INCQS 171); lane 5: negative control strain (ATCC 8739); lane 6: 100 bp molecular weight marker. *eae* gene (384 bp), *stx2* gene (255 bp) and *stx1* gene (180 bp).

Figure 2. Dendrogram showing the phylogenetic relationship between *E. coli* O157 isolates based on PFGE analysis. *Pattern 5: C1 strain – Positive Control isolated from an Argentine outbreak; **Pattern 6: C2 strain - Positive Control – INCQS 00171. IOC – Instituto Oswaldo Cruz.

Figure 3. Resistance patterns of *E. coli* O157 isolates. A. Percentage of resistant strains to each tested antibiotic. B. Profiles and frequency distribution of resistance patterns.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1:

Table 1. Counts of total mesophylls microorganisms (MT), *E. coli* and presence of *Salmonella* spp., *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* isolated in three steps of a bovine slaughter process in Southern Brazil.

Table 02. Identification the species, serotype, gene profile and resistance profile of *Listeria* spp. isolated from bovine carcasses of southern Brazil.

ARTIGO 2:

Table 1. Sampling characterization. Information about season in which samples were collected, city of origin and age of cattle are shown.

Table 2. *E. coli* O157:H7 profiles with genotypic and phenotypic characteristics.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
1.1 INTRODUÇÃO	17
1.2 OBJETIVO GERAL	19
1.2.1 Objetivos específicos	19
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.3.1 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).....	20
1.3.1.1 DTA envolvendo <i>E. coli</i> O157:H7 e produtos cárneos.....	21
1.3.1.2 DTA envolvendo <i>Listeria monocytogenes</i> em carne bovina	22
1.3.1.3 DTA envolvendo <i>Salmonella</i> spp. em carne bovina	24
1.3.2 Processamento e contaminação da Carne	26
1.3.3 Caracterização dos patógenos	28
1.3.3.1 Caracterização <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i>	28
1.3.3.2 Caracterização de <i>Salmonella</i> spp.	30
1.3.3.3 Caracterização de <i>Escherichia coli</i>	32
1.3.3.3.1 Classificação de <i>Escherichia coli</i>	33
1.3.3.3.1.1 <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina shiga (STEC).....	33
1.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na caracterização de patógenos alimentares	37
1.3.5 Tipificação Molecular por PFGE – Perfil de macrorrestrrição	38
1.3.6 Resistência a antimicrobianos	39
1.3.6.1 <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> O157:H7 e resistência a antimicrobianos.....	39
CAPÍTULO 2	42
2.1 RESULTADOS.....	43
2.1.1 ARTIGO 1 – Phenotypic and genotypic characterization of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Salmonella</i> spp. and quantification of microorganisms in different steps of bovine slaughter in Southern Brazil.....	43
2.1.2 ARTIGO 2 – Phenotypic and genotypic diversity of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 isolated from cattle carcasses in Southern Brazil.	43
CAPÍTULO 3	99
3.1 DISCUSSÃO GERAL.....	100

REFERÊNCIAS 116

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) constituem um grave problema de saúde pública e a prevenção dessas doenças é um grande desafio para qualquer governo. Ainda que em muitos países tenham sido alcançados progressos consideráveis na prevenção das DTA, taxas inaceitáveis desses tipos de enfermidades continuam ocorrendo e novos perigos têm sido introduzidos na cadeia produtiva de alimentos (FAO, 2007).

Em muitos países, as carnes e seus derivados têm sido frequentemente identificados como veículos de micro-organismos patogênicos responsáveis por DTA. Como exemplo disso, a carne bovina *in natura*, processada e seus miúdos esteve entre os cinco principais grupos de alimentos envolvidos em DTA no Brasil, durante o período de 2000 a 2011 (BRASIL, 2011).

A bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, com cerca de 208 milhões de cabeças, em contínuo crescimento e com avanços nos índices de produtividade. A participação da carne bovina no mercado de exportações brasileiras aumentou significativamente, passando de 20%, em 2006 (FAO, 2009), para 27% do mercado mundial, em 2009, atendendo às expectativas de consumidores em mais de 180 países (ABIEC, 2009). Em 2010, o Brasil produziu mais de 9,1 milhões de toneladas de carne, das quais exportou 1,5 milhão. O volume e a regularidade da produção a preços competitivos, face ao consumo internacional crescente, consolidaram o Brasil como líder nas exportações mundiais de carne bovina (ABIEC, 2011).

A pecuária de corte é uma atividade econômica de grande importância no Rio Grande do Sul. O estado ocupa a sexta colocação no país em termos de número de bovinos, com um efetivo, no ano de 2006, correspondente a 11,15 milhões de cabeças (Censo Agropecuário, 2006; MASSUQUETTI et al., 2008).

A manutenção do comércio externo da carne bovina brasileira, entretanto, está diretamente ligada a exigências de qualidade e inocuidade, as quais estão cada vez mais restritivas e específicas de acordo com o país importador (PRATA, 2009). Muitos são os padrões bacteriológicos adotados pelos países importadores com o intuito de verificar a qualidade e segurança da carne bovina (ICMSF, 1997; ICMSF 2006).

Micro-organismos indicadores de higiene, como os aeróbios mesófilos e coliformes têm sido utilizados na avaliação dos processos industriais de abate de bovinos e processamento de carne. Além destes, a pesquisa de micro-organismos patogênicos é muito importante para a monitorização da inocuidade de produtos cárneos. Dentre os patógenos de grande relevância na carne bovina *Listeria (L.) monocytogenes*, *Escherichia (E.) coli* enteropatogênicas, especialmente *E. coli* O157:H7, e *Salmonella* spp. ganharam destaque nacional e internacional nos últimos anos (MADDEM et al., 2001; DUFFY et al., 2006; FRANCO et al., 2010; SOFOS et al., 2010).

O músculo de um animal sadio é estéril, contudo, durante o processo de abate, pode ocorrer à contaminação da carne. Micro-organismos patogênicos podem estar presentes no intestino e no couro do animal, nos utensílios, nas mãos dos manipuladores e em diferentes pontos de um abatedouro frigorífico (PARDI et al., 2006; ETCHEVERRÍA et al., 2010). Além disso, a quantidade de pontos potenciais de contaminação varia de acordo com cada planta industrial (ETCHEVERRÍA et al., 2010).

O conhecimento das características fenotípicas e genotípicas de patógenos alimentares, assim como a quantificação de micro-organismos indicadores em diferentes etapas do processamento de carnes bovinas é de grande relevância, devido, principalmente, a importância que a carne apresenta na alimentação humana (NALÉRIO et al., 2009; PRENDERGAST et al., 2011) e de sua importância para a economia do Brasil.

Este trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e micro-organismos indicadores em carcaças bovinas, durante diferentes etapas de abate em um matadouro frigorífico exportador localizado no Rio Grande do Sul.

1.2 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e micro-organismos indicadores em etapas de abate de um matadouro frigorífico exportador do Rio Grande do Sul.

1.2.1 Objetivos específicos

- Quantificar os micro-organismos mesófilos totais e *Escherichia coli* em carcaças bovinas, durante o processo de abate de bovinos;
- Investigar a ocorrência de *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 isoladas de carcaças bovinas em um matadouro frigorífico exportador, no RS;
- Caracterizar fenotípica e genotipicamente os patógenos isolados;
- Investigar o perfil de resistência antimicrobiana dos patógenos isolados;

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)

As DTA ocorrem após a ingestão de alimentos contaminados por agentes biológicos ou químicos. Apesar dos esforços para o controle dessas doenças, o número de casos de DTA vem aumentando em diferentes partes do mundo (EVES & DERVISI, 2005), inclusive no Brasil (BRASIL, 2010).

A incidência global de DTA é difícil de estimar, mas há relatos de que apenas em 2005, 1,8 milhões de pessoas morreram de doenças diarreicas. Nos países industrializados, a porcentagem da população acometida por DTA a cada ano pode ser estimada em até 30%. Nos EUA, as DTA são um grande problema de saúde pública, com uma estimativa de 38,4 milhões de casos, 71.878 hospitalizações e 1.688 óbitos anual (SCALLAN et al., 2011). Na Inglaterra, foram estimados nove milhões de casos de DTA por ano (FORSYTHE, 2010).

No Brasil, a implantação do Serviço de Vigilância Epidemiológica das DTA (VEDTA) ocorreu em 1998, com início das notificações compulsórias de surtos em 1999. Até 2004, foram notificados ao Ministério da Saúde 3.737 surtos, com o acometimento de 73.517 pessoas e registro de 38 óbitos. Segundo dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, ocorreram mais de 3.400.000 internações por DTA no Brasil, de 1999 a 2004, com uma média de cerca de 570 mil casos por ano (CARMO et al., 2005).

No Brasil, os custos com os casos de internação por DTA, de 1999 a 2004, foram de 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano (CARMO et al. 2005). Um estudo realizado no Estado do Paraná revelou que no ano de 2000 foram gastos pelo governo cerca de 2 milhões de reais, somente com internações devido a DTA (AMSON et al., 2006).

A carne bovina *in natura* e seus derivados estão entre os cinco principais grupos de alimentos envolvidos em surtos de DTA no Brasil, no período de 2000 a 2011 (BRASIL, 2011, TONDO & RITTER, 2012).

Carne e produtos cárneos estão frequentemente associados a surtos de DTA, uma vez que representam excelentes meios para a multiplicação

microbiana, devido à variedade de nutrientes, à alta atividade de água e à baixa acidez. Além disso, as carnes podem ser facilmente contaminadas durante o abate dos animais, a evisceração, a manipulação no processamento e a estocagem inapropriada (FORSYTHE 2010, AMSON et al. 2006).

Entre os micro-organismos patogênicos encontrados na carne bovina envolvida em surtos alimentares, merecem destaque *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) (GILL, 1998; FRANCO et al., 2010).

1.3.1.1 DTA envolvendo *Escherichia coli* O157:H7 e produtos cárneos

As STEC, mais especificamente o sorovar O157:H7, tem constituído um sério problema de saúde pública em muitos países, como EUA, Canadá, Japão, Reino Unido, Alemanha e outros (ORDOÑEZ et al., 2005).

Em 1982 ocorreu um surto envolvendo *E. coli* O157:H7 pelo consumo de hambúrguer mal assado em uma grande rede de “fast food” nos Estados Unidos, envolvendo mais de 700 pessoas com 51 casos de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), resultando na morte de quatro crianças (RILEY et al, 1983). Nos EUA, estima-se que a *E. coli* O157:H7 cause, anualmente, 73.000 infecções, 2.168 hospitalizações e 61 mortes (MEAD et al., 1999). No período de 1982 a 2002, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) investigou 350 surtos envolvendo *E. coli* O157:H7 em 49 estados dos EUA, representando 8.598 casos, com 1.493 hospitalizações, 354 casos de SHU e 40 mortes (RANGEL et al., 2005).

Segundo Eppinger et al. (2011), considerando a rápida progressão da *E. coli* O157:H7, desde 1982, até se tornar um dos principais patógenos alimentares em nível mundial, é evidente a necessidade de avaliar criticamente o seu potencial patogênico.

Entre 183 surtos de origem alimentar de *E. coli* O157 relatados nos EUA, de 1982 a 2002, 41% estavam ligados à carne moída e 6% a outros tipos de carnes (RANGEL et al., 2005). No Japão, entre 1991 e 1995, mais de 80% das *E. coli* isoladas foram identificadas como O157:H7, onde, em 1996, um surto afetou 6.300 crianças, resultando em 2 mortes (FAIRBROTHER et al., 2006).

Na América do Sul, vários casos de DTA por *E. coli* O157:H7 têm sido registrados no Chile e na Argentina, sendo que este último país apresenta a maior incidência de casos de SHU em crianças com menos de cinco anos, no mundo (RIVAS et al., 2008). Nesse país, *E. coli* O157:H7 está principalmente envolvida em infecções devido ao consumo de carne moída mal cozida (ORDOÑEZ et al., 2005; RIVAS et al., 2008; RIVERO et al., 2011).

No Brasil, ainda são poucos os relatos científicos envolvendo *E. coli* O157:H7. No Estado de São Paulo, foi identificada uma cepa desse micro-organismo nas fezes de um menino de oito anos com diarreia e demais sinais de SHU (IRINO, et. al., 2002; GUTH et al., 2002). De acordo com Eduardo et al. (2002) foram isoladas duas cepas de *E. coli* O157:H7 de pacientes com diarreia, residentes em Campinas, SP. Um deles apresentava história de ingestão de hambúrguer e outro de carne moída. Entretanto, não foi possível a comprovação laboratorial dos alimentos suspeitos, bem como, não se conseguiu estabelecer a relação entre os casos.

Os alimentos mais associados à transmissão de STEC são: carne bovina mal passada, leite cru, queijos feitos com leite cru, vegetais crus (contaminação cruzada) e produtos cárneos fermentados (BLACKBURN et al., 2000; HUSSEIN et al., 2005; SANDRINI et al., 2007).

1.3.1.2 DTA envolvendo *Listeria monocytogenes* em carne bovina

Listeria monocytogenes é um patógeno de origem alimentar, responsável por surtos esporádicos em todo o mundo, tornando a listeriose de origem alimentar uma preocupação de saúde pública (RUIZ-BOLIVAR et al., 2011). Preocupação esta, inclusive, por estarem presentes no trato gastrointestinal dos animais, sendo comum a contaminação da carcaça e cortes de carnes durante o abate ou processamento inadequado (KASNOWSKI, 2004).

Mesmo tendo uma ocorrência baixa, a listeriose alimentar é uma doença grave com altas taxas de letalidade em pessoas que fazem parte do grupo de risco (20-30%) em comparação com outros micro-organismos patogênicos, tais como *Salmonella* spp. (FAO/ WHO, 2005).

O meio científico foi despertado para o perigo da listeriose durante a década de 80, quando uma série de surtos ocorreu na América do Norte e Europa (SCHLECH, 1988).

Após um surto de listeriose ocorrido em 1985, na Califórnia, sugeriu-se o envolvimento de produtos cárneos como veículos da infecção e esses alimentos começaram a serem identificados em diversos surtos e casos esporádicos de listeriose humana em diversos países (BADER, 1993; JACQUET et al., 1995). O primeiro surto comprovado de listeriose causado pela ingestão de produtos cárneos contaminados envolveu um tipo de patê importado pelo Reino Unido, envolvendo 366 doentes e 63 mortes (McLAUHLIN et al., 1991) e o primeiro relato nos Estados Unidos foi de um caso esporádico relacionado ao consumo de embutido de carne de peru, por uma paciente com câncer (MMWR, 1989). Uma grande variedade de carnes e produtos cárneos, além de plantas de processamento de carne, tem sido associada à contaminação por *L. monocytogenes* (PECCIO et al., 2003; GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004; BARBALHO et al., 2005).

De acordo com dados da *Foodborne Diseases Active Surveillance Network* (FoodNet) a incidência de casos confirmados de listeriose, nos EUA, em 2004, foi de 2,7 em 1 milhão de pessoas, o que representou um decréscimo de 40% no período entre 1996 a 2004. Em 2004 foram identificados 15.806 casos confirmados de DTA nas regiões abrangidas pela FoodNet, e destes 120 foram casos de listeriose responsáveis pelo maior índice de hospitalizações (91%) e pela maior taxa de mortalidade (17%), confirmando que apesar da baixa incidência apresenta uma alta taxa de letalidade quando comparada com outras enfermidades transmitidas por alimentos, como salmonelose e campilobacteriose (MMWR, 2010).

O relatório de 2011 da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e do Centro Europeu de Controle de Doenças (ECDC) (2011) demonstraram que a listeriose em humanos aumentou 19% em 2009 em relação a 2008, quando ocorreram 1.645 casos confirmados, tendo sido registradas 270 mortes nos países-membros da União Europeia no ano de 2009. Nas análises realizadas em 2009, *L. monocytogenes* foi encontrada, sobretudo, em fezes de bovinos e após o abate na sua carne.

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - RDC) nº 12/2001 aprovou o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos, somente estabelecendo a pesquisa de *L. monocytogenes* (ausência em 25g) (BRASIL, 2001) em queijos de média e alta umidade. Em 2009, a Instrução Normativa (IN) nº 9 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu limites de tolerância para a presença de *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para consumo, porém essa legislação não é aplicada à carne “*in natura*”. No mesmo país, pesquisas publicadas relatam a ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em alimentos como vegetais (HOFER, 1975), camarão (DESTRO et al., 1996), carnes, leite e derivados (DESTRO et al., 1991; SILVA et al., 1998; SILVA et al., 2004), carcaça bovina (GUEDES, 2010) e ambientes como esgotos (HOFER, 1975) e solo (HOFER, 1984) mas, até o momento, nenhum caso clínico de listeriose foi oficialmente associado ao consumo de alimentos.

1.3.1.3 DTA envolvendo *Salmonella* spp. em carne bovina

Atualmente, as infecções causadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* são mundialmente consideradas como as mais importantes causas de DTA, sendo considerado um grande problema de saúde pública (FRANCO et al., 2010, TONDO & RITTER, 2012).

Segundo Santos et al. (2002), a salmonelose é uma das zoonoses com maior impacto sobre a saúde pública em todo o mundo, devido à endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade no controle. Além disso, esta infecção alimentar ocasiona maior número de óbitos do que aquelas causadas por outros micro-organismos. Segundo Jay (2005) a salmonelose, frequentemente, é causada pelo consumo de carne.

Salmonella foi um dos micro-organismos associado a graves surtos de DTA no Brasil e no mundo, nos últimos anos. Na Inglaterra e países vizinhos, 90% dos casos de DTA foram associados a essa bactéria. Dados publicados em diversos países indicam o aumento dos relatos de casos com hospitalizações e mortes em pacientes mais susceptíveis. Os veículos mais comuns dos surtos de salmonelose humana são a água e os alimentos

contaminados com fezes de animais ou humanos, carne moída, carnes de aves, suínos e bovinos (MEAD et al., 1999), maionese e ovos (COSTALUNGA & TONDO, 2002).

Conforme estudos realizados por Collard et al. (2008) *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar isolado com maior prevalência nos casos alimentares relacionados com os surtos nos Estados Unidos e também na Europa (MMWR, 2010). De acordo com Scallan et al. (2011), diferentes sorovares de *Salmonella enterica* estão envolvidos em casos de surtos alimentares nos Estados Unidos.

Atualmente, *Salmonella* spp. é um dos micro-organismos mais envolvidos em casos e surtos de doenças de origem animal em diversos países, inclusive no Brasil. Dados publicados nos Estados Unidos, Canadá e Japão indicam que os relatos de ocorrência de salmonelose de origem alimentar aumentaram nos últimos anos (FRANCO et al., 2008).

No Brasil, um notável aumento na prevalência de *S. Enteritidis* em infecções alimentares de humanos vem sendo registrado nos últimos anos (FRANCO et al., 2000; SANTOS et al., 2000; GEIMBA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009; 2010; TONDO & RITTER, 2012).

A real prevalência de salmonelose no Brasil não é conhecida, pois apesar de se tratar de uma doença de notificação compulsória, nem sempre os surtos são notificados às autoridades sanitárias e isso ocorre devido ao fato de que a maioria dos casos de gastroenterites transcorre sem a necessidade de hospitalizações e sem o isolamento do agente causal no alimento incriminado (SANTOS et al., 2002).

A Vigilância Sanitária do RS aponta *Salmonella* sp. como o agente etiológico responsável pelo maior número de casos de DTA, desde 1997 (TONDO & RITTER, 2012), onde estudos de surtos alimentares durante o período de 1997 a 1999 revelaram que 35,7% dos surtos investigados foram causados por *Salmonella* sp. (COSTALUNGA & TONDO, 2002). Surtos de salmonelose atingiram 47,4% (334 surtos) do total de 1.037 surtos investigados no ano de 2000, onde no mesmo ano a carne bovina foi o 3º alimento mais envolvido nos casos de surtos alimentares, no RS (RS, 2000; OLIVEIRA et al., 2006; TONDO & RITTER, 2012). No período de 2002 a 2004, no RS, de acordo com estudo realizado por Wagner (2010) também se concluiu que a *Salmonella*

foi o principal agente etiológico responsável por DTA no RS nesse período, tendo sido responsável por cerca de um terço dos casos investigados.

1.3.2 Processamento e contaminação da carne

A contaminação microbiológica das carcaças bovinas ocorre principalmente durante o processamento, em etapas como a esfolagem, evisceração, cortes, embalagem, estocagem e distribuição para pontos comerciais (GILL et al., 1998; GILL et al., 2003). A esfolagem constitui um dos principais pontos de contaminação do abate, devido à possibilidade de contaminação de carcaças por micro-organismos existentes no couro, nos pelos e cascos dos animais (FONTOURA, 2006).

A contaminação externa da carne é uma possibilidade contínua, desde o momento da sangria do animal, o processamento de abate e seu consumo. No próprio abatedouro existe um grande número de fontes potenciais de infecção por micro-organismos, que incluem o couro, as sujidades aderidas a ele, o conteúdo do trato intestinal, se liberado durante as operações de evisceração, a contaminação do ar, a água (utilizada para lavagem da carcaça ou piso), os instrumentos utilizados na evisceração, como facas, serras, cutelos e ganchos, entre outros (LAWRIE, 2005).

A contaminação inicial de carne ocorre durante o abate, onde deficiências de higiene nesta fase podem levar a uma contaminação considerável. Neste caso, a contaminação da carcaça durante o abate se torna mais difícil de ser compensada, mesmo pelas mais rigorosas medidas de higiene durante as fases posteriores do processamento da matéria-prima (UNTERMANN, 1997).

Lawrie (2005) relatou que embora algumas fontes de contaminação sejam removidas quando as carcaças deixam a sala de matança, a contaminação pelo contato com superfícies não higienizadas, pelos manipuladores e pelos micro-organismos aeróbios, irá permanecer como uma possibilidade em todas as operações durante a história subsequente da carne – resfriamento, congelamento, processamento, corte embalagem, transporte, venda e manuseio doméstico.

Na avaliação dos processos industriais de abate de bovinos e processamento de carne, são utilizados micro-organismos indicadores de higiene, como aeróbios mesófilos, coliformes e *E. coli*. Além desses indicadores, a pesquisa direta de micro-organismos patogênicos é fundamental para garantia da inocuidade de produtos cárneos (DUFFY et al., 2006).

Micro-organismos indicadores são grupos ou espécies de micro-organismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (Franco et al., 2008).

E. coli é um indicador de contaminação fecal, uma vez que é encontrada no conteúdo intestinal de animais de sangue quente, inclusive dos humanos. O significado de sua presença nos alimentos deve ser avaliado por dois ângulos: indica contaminação microbiana de origem fecal, e, portanto, condições higiênicas insatisfatórias; e o outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens são comprovadamente patogênicas para o homem e animais (HOBBS et al., 1999). A presença de coliformes totais e *E. coli* nas carcaças sugere que outros micro-organismos de origem fecal, incluindo *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp., podem estar presentes (GRAU, 1986; GIL et al., 1996; JAY, 2005).

De acordo com Pardi et al. (2001), a carne e seus derivados constam entre os alimentos que mais preocupam em razão dos riscos que oferecem, riscos estes que, quando de natureza microbiana, apresentam grande potencial de causar toxinfecções alimentares.

Nesse sentido, a precisa caracterização de micro-organismos patogênicos isolados nas carnes é de grande importância, uma vez que pode ser útil na avaliação dos riscos que esses alimentos oferecem. Para isso, métodos de tipificação baseados na análise de características fenotípicas e genotípicas podem ser ferramentas essenciais para a correta identificação microbiológica e estudos epidemiológicos, tanto tradicionais quanto moleculares. Esses métodos podem ser indispensáveis na identificação correta de fontes de contaminação cruzada, dentro de uma linha de processamento. Alguns dos métodos fenotípicos frequentemente utilizados na identificação de

microrganismos são a sorotipificação, a fagotipificação e a resistência a antimicrobianos (LAILLER et al, 2002; YANG et al., 2002), enquanto que dentre os métodos genotípicos pode-se destacar aqueles baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) e na Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE)

1.3.3 Caracterização dos patógenos

1.3.3.1 Caracterização de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes*

Os micro-organismos do gênero *Listeria* são bastonetes Gram positivos curtos, não formadores de endósporos, anaeróbios facultativos, que possuem em média 1 a 2 µm de comprimento e 0,5 µm de largura (FRANCO et al., 2008; FORSYTHE, 2010).

As características bioquímicas de *Listeria* sp. são catalase positiva, oxidase negativa, não hidrolisam uréia, não reduzem o nitrato, são vermelho de metila e Voges-Proskauer positivo, não produzem indol e hidrolisam esculina (FRANCO, 2008). A diferenciação das espécies do gênero *Listeria* sp. está baseada na presença de atividade hemolítica e na fermentação de açúcares, como D-xilose, L-Rhamnose e Manitol (STEPHAN, 2006). Ela apresenta multiplicação na faixa de 2,5 °C a 44 °C, embora existam relatos sobre a multiplicação a 0 °C, suportando repetidos congelamentos e descongelamentos (JAY, 2005; FRANCO, 2008; JEYALETCHUMI et al., 2010).

Até 1961, *L. monocytogenes* era a única espécie reconhecida do gênero *Listeria* (RYSER et al., 2006), mas atualmente o gênero *Listeria* inclui oito espécies – *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. marthii* e *L. rocourtiae* - dos quais apenas *L. monocytogenes* é patógeno primário de doença humana (CRUZ et al., 2008; GOPAL et al., 2010). As espécies de *Listeria* são caracterizadas por seus antígenos que determinam 17 sorovares, dos quais 13 são representados por *L. monocytogenes*. *Listeria innocua* tem sido considerado como um indicador da contaminação por *L. monocytogenes* (AGUADO et al., 2004) e por esse motivo, tem sido investigada em abatedouros frigoríficos.

Wiedmann et al. (1996) propuseram o agrupamento de cepas de *L. monocytogenes* em três linhagens distintas, sendo que a linhagem I inclui os sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e, a linhagem II, 1/2a, 1/2c, 3a e 3c e a linhagem III, 4a e 4c. Esta divisão foi baseada em características obtidas pela técnica de Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) dos genes de virulência *hly*, *inlA* e *actA*, combinadas com a origem dos isolados (humano ou animal) e seus sorotipos.

Em relação aos isolados alimentares, os principais sorovares encontrados pertencem ao grupo antigênico 1/2 (1/2a, 1/2b e 1/2c) (GERNER-SMIDT et al., 2007). De acordo com McLauchlin (1990), os sorovares 1/2a, 1/2b e 4b são responsáveis por 90% dos casos de listeriose humana, sendo que o sorovar 4b é identificado em 50% destes. Enquanto *L. monocytogenes* 4b são isoladas principalmente de surtos epidêmicos de listeriose, os sorotipos 1/2a e 1/2b estão ligados à infecção esporádica *L. monocytogenes* (WIEDMANN et al., 1996, TRABULSI et al., 2005).

Todas as cepas de *L. monocytogenes* são consideradas igualmente patogênicas, já que faltam marcadores fenotípicos e/ou genotípicos para determinação da virulência (CRUZ et al., 2008). No entanto, diversos estudos realizados com imunodeterminantes superficiais (JACQUET et al., 2004) e modelos de infecção em animais de experimentação (LARSEN et al., 2002; OLIER et al., 2002) sugerem que a virulência de *L. monocytogenes* seja heterogênea.

Os mecanismos pelos quais *L. monocytogenes* causa a listeriose ainda não estão bem definidos. Sabe-se que é um patógeno intracelular com habilidade de penetrar, multiplicar-se no interior do citoplasma da célula do hospedeiro (macrófagos, fibroblasto, eritrócitos) e invadir células adjacentes sem deixar o citoplasma do hospedeiro. Dentre os fatores de virulência necessários para o parasitismo intracelular de *L. monocytogenes*, seis proteínas são codificadas por genes localizados em um locus de 9Kb, denominado região central de virulência, denominado de LIPI-1 (Ilha de Patogenicidade de *Listeria* 1). Os genes que fazem parte dessa região são *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *sctA* e *plcB*, onde esse *cluster* está organizado por uma região monocistrônica *hly*, que codifica uma única proteína, a hemolisina. A

proteína LLO (listeriolisina O ou hemolisina), codificada pelo gene *hly*, é o principal fator de virulência de *L. monocytogenes*, e sua atividade hemolítica pode ser observado ao redor das colônias em meio ágar sangue (DUSSURGET et al., 2004).

1.3.3.2 Caracterização de *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreendem bacilos Gram negativos não produtores de esporos. São anaeróbios facultativos, produz gás a partir da fermentação de D-glicose (exceto *S. Typhi*) e outros carboidratos, porém geralmente não fermentam a lactose, e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios, exceção feita à *S. Pullorum* e à *S. Gallinarum*, que são imóveis; não produzem indol, oxidase negativo, catalase positivo (DOYLE et al., 2007) não são produtores de acetoina, produzem H₂S, não hidrolisam uréia, mas descarboxilam lisina e ornitina (D'AUOST et al., 2007).

A temperatura ideal de multiplicação é 35 °C a 37 °C, sendo a mínima de 5 °C e a máxima 47 °C; no entanto, alguns sorovares são capazes de se multiplicar em temperaturas mais elevadas (≤ 54 °C), enquanto outros têm capacidade psicotrófica, podendo se multiplicar em temperaturas de refrigeração de 2 °C a 4 °C. São sensíveis ao calor e geralmente são destruídas pelo aquecimento a 60 °C, por 15 a 20 minutos. O congelamento provoca uma redução significativa no número de células viáveis, mas não a destruição completa. Apresentam pH ótimo de multiplicação entre 6,5 e 7,5 (BAYLE et al., 2010; D'AUOST et al., 2007).

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* sendo que a espécie *S. enterica* contém seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizone*, *S. enterica* subsp. *Houtenane* e *S. enterica* subsp. *indica*. Em 2004, foi proposta a inclusão de uma terceira espécie denominada *S. subterrânea*, isolada de sedimento da região aquífera de Oak Ridge, Estados Unidos. Como esta espécie apresenta 96,4 % de similaridade com *S.*

bongori, não há um consenso se é uma nova espécie ou não (BAILEY et al., 2010).

O gênero *Salmonella* contém muitos sorovares de acordo com os antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi). São conhecidos atualmente 2.610 sorovares, baseados em reações bioquímicas e sorológicas (GUIBOURDENCHE et al., 2010; BAILEY et al., 2010). A maioria dos sorovares não é adaptada a um único hospedeiro, podendo causar doenças tanto no homem como em animais. No entanto, apenas um pequeno número destes sorovares está frequentemente associado à doença (JAY, 2005).

Salmonella spp. é uma das principais causas de DTA no mundo e pode causar enterocolite (salmonelose), febre tifoide e septicemia (febre entérica) (FRANCO et al., 2008; ARSLAN et al., 2010).

Lázaro (1999) ressalta que, de um modo geral, a salmonelose é uma infecção de alta morbidade, porém de baixa mortalidade, resultando em perdas econômicas elevadas, devido à necessidade de cuidados médicos, hospitalização e queda da produtividade do indivíduo acometido por esta enfermidade.

Segundo Franco e Landgraf (1996) as *Salmonella* apresentam simultaneamente múltiplos fatores de virulência quando causam doença no homem, e esses podem agir sinergeticamente ou individualmente. De acordo com Campos (1999) a patogenicidade das *Salmonella* varia de acordo com o tipo sorológico, a idade e condições de saúde do hospedeiro.

A patogenicidade de *Salmonella* depende de uma variedade de fatores de virulência que ajudam o patógeno em mecanismos de adesão e invasão, tais como, o operon SPV, o qual é composto por cinco genes (*spvRABCD*) que potencializa a disseminação sistêmica de *Salmonella* e ajuda a sua replicação em sítios extra-intestinais (GEBREYES et al., 2009), o gene (*invA*) que existe na maior parte dos sorotipos de *Salmonella*, sendo relacionado com a invasão da mucosa intestinal (FLUIT, 2005) e o gene *sef*, que codifica fímbrias e é relacionado à adesão (VAN ASTEN et al., 2005). De acordo com Zou et al. (2012) é importante identificar os genes de virulência de *Salmonella* que são responsáveis por estabelecer a infecção em humanos.

1.3.3.3 Caracterização de *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* e *E. blattae* sendo a primeira a de maior importância em saúde pública (TRABULSI et al., 2005). *E. coli* é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo da família *Enterobacteriaceae* (ANGELES, 2002). Foi isolada pela primeira vez em 1885 das fezes de crianças com diarreia por um bacteriologista alemão chamado Dr. Theodor Escherich (HUTTEN et al., 2000).

São bastonetes móveis devido a flagelos peritríquios, sendo algumas cepas imóveis. São catalase positiva, oxidase negativa, vermelho de metila positiva, Voges-Proskauer negativo e usualmente não utilizam citrato, característica bastante explorada na identificação da espécie. Reduzem nitrato a nitrito, não produzem H₂S; uréia e lipase negativa. Produz indol e a maioria das cepas possui a enzima β-glucoronidase (KRIEG et al., 1984; HOLT et al., 1994). Diferente de *Salmonella* e de *Shigella*, a maioria das cepas de *E. coli* fermentam a lactose produzindo ácido e gás (FRANCO et al., 2008).

É um mesófilo capaz de se multiplicar entre 7 °C e 46 °C, sendo 37 °C a temperatura ótima, embora existam cepas que podem se multiplicar a 4° C. São destruídos a 60 °C por alguns segundos, mas resistem por vários meses em temperatura de refrigeração (GERMANO et al., 2001).

E. coli é encontrada normalmente no intestino dos animais e homem, suprimindo bactérias nocivas e participando da síntese de algumas vitaminas como as do complexo B e vitamina K (MARGALL et al., 1997). Esta estreita associação com as fezes do homem e dos animais representa a base do teste para verificação da contaminação fecal da água e dos alimentos, tão usado em saúde pública, por meio das análises de Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Termotolerantes e NMP de *E. coli* (TRABULSI et al., 1989, 2005).

Devido aos coliformes termotolerantes serem micro-organismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária de alimentos e água, a sua análise fornece informações úteis na avaliação das condições de abatedouros – frigoríficos, além de ser útil para verificar a eficácia dos processos utilizados para evitar a contaminação por patógenos (RUBY et al., 2009).

As contagens de coliformes totais e *E. coli* podem estimar falhas na higiene e indicar contaminação de origem fecal, sendo que elevadas contagens

destes grupos de micro-organismos podem estar relacionadas a níveis significativos de enteropatógenos, como *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 (JAY, 2005).

1.3.3.3.1 Classificação de *Escherichia coli*

E. coli é classificada sorologicamente em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica: antígenos O ou somático para os sorogrupos, relacionados com polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares ou H para os sorotipos, e o antígeno K ou capsulares, importantes na patogenicidade (CAMPOS et al., 2004). Este esquema, O: H: K, estabelecido por Kaufmann em 1947, possibilitou um grande avanço na identificação de *E. coli*. Os antígenos de fímbrias formam um quarto sistema de sorotipificação, especificamente para as cepas que apresentam essas estruturas (FRANCO et al., 2008).

Outro aspecto a ser considerado é que diversas cepas de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e para os animais. Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia, as cepas de *E. coli* consideradas patogênicas são, atualmente, agrupadas em seis grupos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC ou EAEC), *E. coli* de aderência difusa e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (NATARO et al, 1998; BERTÃO, 2007; FRANCO et al., 2008). De acordo com Kaper et al. (2004), embora essa classificação continue sendo usada pela maioria dos autores, já se torna evidente que alguns grupos incluem cepas diferentes. Desta forma, as EPEC e EAEC foram divididas em típicas e atípicas e as EHEC passaram a constituir uma subcategoria de *E. coli* produtora da toxina shiga (STEC).

1.3.3.3.1.1 *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC)

A primeira descrição de STEC ocorreu em 1977, quando alguns isolados de *E. coli* pertencentes aos sorogrupos O18, O26, O111, O126 e O128 causaram efeito citotóxico em células Vero (célula epitelial renal de macaco verde africano, espécie *Cercopithecus aethiops*), surgindo então o termo

verotoxina ou verocitotoxina (KONOWALCHUK et al., 1977; EDUARDO et al., 2002). Em 1982, O'Brien et al. descreveram que certas cepas de EPEC produziam uma citotoxina letal para células HeLa (linhagem contínua de células derivadas de carcinoma cervical humano). Esta toxina comportava-se como a toxina de Shiga produzida por *Shigella dysenteriae*, ou seja, inibia a síntese proteica em células HeLa, era enterotóxica para intestino de coelhos e letal para camundongos; por esta razão foi chamada de toxina do tipo shiga. Posteriormente estes isolados bacterianos foram chamados de *E. coli* verocitotoxigênica (VTEC) ou *E. coli* produtora da toxina shiga (STEC) devido ao alto grau de homologia estrutural e funcional com a toxina shiga produzida por *Shigella dysenteriae* tipo I (CALDERWOOD et al., 1996).

As STEC são também chamadas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou de *E. coli* verotoxigênicas (VTEC), pois compreendem uma classe de cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas, incluindo *E. coli* O157:H7, associada à enterocolite hemorrágica em indivíduos com qualquer idade (EDUARDO et al., 2002).

Na década de 1980 aconteceu o primeiro isolamento em um surto de diarreia sanguinolenta, o qual foi associado à ingestão de carne de hambúrguer contaminada e mal cozida. Este isolado foi caracterizado como *E. coli* O157:H7 devido aos seus antígenos somáticos e flagelares (RILEY et al., 1983), sendo reconhecido como patógeno humano responsável por diarreias leves até doenças severas como Colite hemorrágica (CH) e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) (O'BRIEN et al., 1983) ou púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (EDUARDO et al., 2002).

Devido à associação de *E. coli* O157:H7 com CH, as cepas pertencentes a este sorotipo foram denominadas *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC). Atualmente, o termo STEC é utilizado para caracterizar cepas de *E. coli* produtoras de shiga toxinas (Stx), enquanto EHEC caracteriza cepas de *E. coli* que produzem Stx e também induzem uma lesão histopatológica (*attaching and effacing*, A/E), semelhante à produzida por EPEC (DAUBEN, 2005) e possuem o plasmídeo pO157 associado à produção de enterohemolisinas e potenciais fatores de aderência (EDUARDO et al., 2002). Conforme WHO (1998) e Eduardo et al. (2002), todas as cepas EHEC são patogênicas, sendo seu principal representante o sorotipo O157:H7.

Os bovinos são considerados os principais veiculadores de *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC), uma vez que os animais infectados raramente apresentam sintomas evidentes e eliminam os micro-organismos continuamente pelas fezes, contaminando o ambiente e os alimentos produzidos (PHILLIPS, 1999; SANDRINI et al., 2007; STELLA et al., 2008).

Diversas pesquisas em diferentes países têm isolado sorotipos patogênicos de STEC a partir de fezes de bovinos saudáveis (CERQUEIRA et al., 1999, MOREIRA et al., 2003; HUSSEIN et al., 2005; SANDRINI et al., 2007; STELLA et al., 2008).

As principais características que distinguem *E. coli* O157:H7 dos demais sorovares de *E. coli* são a multiplicação pobre ou nula a 44° C, a temperatura máxima de multiplicação em caldo EC de aproximadamente 42° C, a incapacidade de utilizar o sorbitol e produzir a enzima β -glucuronidase, além de tolerar menores concentrações de sais biliares (JAY, 2005; FRANCO et al., 2008). A dose infectante de *E. coli* O157:H7 é ainda desconhecida, mas através de surtos investigados nos Estados Unidos, acredita-se que seja tão baixa quanto da *Shigella*, ou seja, menos que 10 organismos por grama de alimento consumido (FDA, 2008).

O principal fator de virulência das STEC é a produção das toxinas shiga (Stx), extremamente potentes e responsáveis por muitos dos sintomas observados nos pacientes infectados (NATARO & KAPER, 1998).

A Stx não é capaz de formar poros e alcançar o citoplasma da célula-alvo e o mecanismo ocorre através da aderência da STEC a superfície dos enterócitos, onde rompe o citoesqueleto apical, gerando a típica lesão A/E “*attaching and effacing*”, onde existe um receptor do lado externo da bactéria que é translocada para dentro da célula epitelial no início do processo infeccioso. Uma vez estabelecida no cólon, a STEC libera uma ou mais toxinas (shiga-like) (NATARO, 2008). Tais toxinas (Stx1 e Stx2) possuem uma estrutura AB5 que consiste de uma subunidade A ligada a um pentâmero de cinco monômeros de subunidades B, responsáveis pela ligação da toxina às células hospedeiras. O receptor principal para Stx1 e Stx2, identificados nos seres humanos, é a globotriaosilceramida ou receptor Gb3, e sua expressão na superfície da célula alvo está ligada à citotoxicidade (JACEWICZ et al., 1995). Nos seres humanos esses receptores estão presentes principalmente nas

células epiteliais do intestino, nas células do endotélio vascular e nas células do epitélio renal (O'BRIEN & HOLMES, 1987).

Stx contribuem, mas não são os únicos fatores decisivos para a diarreia na infecção por STEC. Outros fatores também são considerados relevantes, como a presença do plasmídeo altamente conservado, chamado pO157, que contém o gene *ehxA* (ou *hlyA*), que codifica uma hemolisina, chamada de enterohemolisina de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC *Hly*) (NATARO & KAPER, 1998; PATON & PATON, 1998).

Também foi relatada uma relação direta entre a presença do gene *eae* e a capacidade da STEC em causar doenças nos seres humanos. Este gene *eae* codifica uma proteína externa da membrana, denominada intimina. O processo de adesão é mediado por esta proteína que interage com a proteína tirosina translocada para a superfície do enterócito. Da interação intimina /tirosina resulta a lesão A/E (KAPER et al., 1998; MENG et al., 2001). A lesão A/E caracteriza-se por uma estreita ligação entre a membrana do enterócito e a parede bacteriana, o que desencadeia alterações no citoesqueleto celular com consequente perda das microvilosidades dos enterócitos, o que por si só já é suficiente para causar diarreia (TRABULSI et al., 2005; JAY, 2005; KARMALI et al., 2010).

De acordo com estudos realizados por Karmali (1989) as Verotoxinas (VTs) consistem de duas famílias de citotoxinas chamadas VT₁/VT₂ (Stx₁ e Stx₂), que são codificadas por bacteriófagos lisogênicos, estão associadas com doenças em humanos e possuem a mesma ação sobre células Vero.

A citotoxina Stx1 é um grupo homogêneo de toxinas que foram originalmente descritas por Konolwalchuk et al. (1977), purificada por O'Brien et al. em 1983 e codificadas por fagos lisogênicos (NATARO & KAPER, 1998). Apresentam a mesma natureza glicolipídica dos receptores nas células intestinais e em células de cultivo celular como célula Vero e HeLa (KARMALI, 1989).

De acordo com Karmali (1989) a família Stx apresenta dois grupos principais, imunologicamente distintos e não passíveis de reações cruzadas, chamados de Stx1 e Stx2. Uma cepa STEC pode expressar apenas a Stx1, apenas a Stx2, ou ambas. Dados epidemiológicos sugerem que a Stx2 é mais importante que a Stx1 no desenvolvimento de SHU (GRIFFIN, 1995). Vários

relatos indicam que as cepas de *E. coli* O157:H7 que expressam apenas a Stx2 têm maior probabilidade de provocar SHU do que as que expressam apenas a Stx1 ou, curiosamente, ambas (PICKERING et al., 1994).

Embora mais de 200 sorotipos de *E. coli* produzam Stx, somente um limitado, mas crescente número, é considerado patogênico ao homem. O sorotipo O157:H7 é o predominante entre as *E. coli* enterohemorrágicas e o mais frequentemente associado a surtos de origem alimentar (VOLD et al., 1998).

1.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na caracterização de patógenos alimentares

Dentre os métodos mais modernos para a detecção e caracterização de microrganismos em alimentos, muitos envolvem o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SILVA & EIROA, 1993; FRANCHIN et al., 2006). A alta especificidade desse método é devido à utilização de sequências de nucleotídeos características dos microrganismos alvos, as quais são chamadas de *primers* ou sequências iniciadoras. Os *primers* anelam-se as sequências alvo específicas, permitindo que a enzima polimerase sintetize uma nova cadeia de DNA, amplificando o fragmento desejado. Depois de repetidos ciclos de amplificação, os fragmentos podem ser visualizados a olho nu, permitindo a identificação e caracterização do micro-organismo alvo.

Alguns dos genes mais frequentemente utilizados para a detecção de *Salmonella* por PCR incluem: *invA* (gene da invasão proteica), *spv* (gene de virulência – que potencializa a disseminação sistêmica e ajuda a replicação em sítios extraintestinais) (FLUIT, 2005; GEBREYES et al., 2009; CHEN et al., 2010) e o gene *sefA*, o qual codifica fimbrias necessárias à adesão (VAN ASTEN et al., 2005).

Para a identificação de *Listeria* spp. por PCR, alguns trabalhos têm utilizado os genes *prs*, *lmo* e *orf* (genes de caracterização de *Listeria monocytogenes*)(DOUMITH et al. 2004; KÉROUANTON et al., 2010), além do gene de virulência *hlyA* (fator de virulência - hemolisina)(BORDER et al. 1990).

Para detecção de *E. coli* O157:H7 os genes das toxinas *stx1* e *stx2* (NATARO & KAPER, 1998) o gene *rfbO* (que codifica o antígeno somático do

sorotipo O157), *hlyA* (gene que codifica o antígeno somático do sorotipo pO157) e o gene *eae* (gene da intimina) são alguns genes mais comumente utilizados para identificação desse micro-organismo (YOSHITOMI et al., 2006).

1.3.5 Tipificação Molecular por PFGE – Perfil de macrorrestrição

A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerada o padrão ouro para a tipificação de patógenos de alimentos, devido ao seu alto poder de discriminação e reprodutibilidade (HUNTER et al., 2005; RIBOT et al., 2006). Ela tem sido considerada uma técnica importante no caso de investigações epidemiológicas, assim como para a identificação de prováveis fontes de contaminação na cadeia produtiva de alimentos (KÉROUANTON et al., 2010; CDC, 2010).

Por esta técnica, é possível analisar todo o DNA de um microrganismo e não apenas uma região específica do DNA, como ocorre em outras técnicas moleculares de tipificação (FOLEY et al., 2007). Após o isolamento, os microrganismos são imobilizados em pequenos cubos de agarose, sendo então suas células lisadas, purificadas e seus DNA submetidos à restrição com enzimas específicas. Em seguida, os pequenos cubos de agarose são colocados em um gel de agarose, o qual é submetido à eletroforese de campo pulsado, tornando possível a separação dos fragmentos de DNA e a formação de perfis de restrição. Os perfis são comparados, possibilitando correlacionar microrganismos isolados de diferentes origens.

A tipagem molecular por PFGE tem se mostrado útil na comparação entre cepas à primeira vista distintas, conforme foi demonstrado por Senczek et al. (2000) onde, na Suíça, obtiveram 89 isolados de *L. monocytogenes* de carne bovina e, destes, após o emprego da PFGE, obtiveram 15 perfis diferentes de *L. monocytogenes*, onde 2 perfis predominaram, o perfil B foi predominante no ambiente da área de processamento, enquanto o perfil E predominou nos produtos cárneos.

De acordo com estudo epidemiológico realizado por Stevens et al. (2008), no Senegal, onde utilizando PFGE para caracterização de *Salmonella* spp na cadeia produtiva de carne bovina, analisaram cepas de diferentes sorovares de *Salmonella*, isoladas de carne bovina de abatedouros oficiais e

também do varejo, e agruparam os sorovares em 17 genótipos diferentes, concluindo que os frigoríficos e o varejo contribuíram de forma igual na contaminação com *Salmonella* spp. e manutenção na carne.

Um estudo realizado por Jeorg et al. (2013), nos Estados Unidos, analisando um total de 1.716 amostras de fezes de bovino e amostras de água do local, isolaram 341 cepas de *E. coli* O157:H7. A tipificação dos 341 isolados pelo PFGE mostrou nove diferentes perfis genotípicos, dos quais sete eram 93-98% similar, verificando a prevalência de alguns sorovares de *E. coli* O157:H7 nos bovinos durante os anos e a persistência no ambiente de algumas dessas cepas de *E. coli* O157:H7.

A utilização de técnicas moleculares, como PFGE, para a identificação de cepas de *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *E. coli* O157:H7 possibilita rastrear a disseminação de patógenos dentro de uma planta processadora de alimentos. Também auxilia na detecção da presença de cepas persistentes colonizando a indústria, formando biofilmes, podendo, desta maneira, contaminar continuamente, através de contaminação cruzada, os alimentos ali processados (SENCZEK et al., 2000; BERRANG et al., 2005).

1.3.6 Resistência a antimicrobianos

1.3.6.1 *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 e resistência a antimicrobianos

Os antimicrobianos têm desempenhado um papel indispensável na diminuição de doenças e mortes associada com doenças infecciosas em animais e humanos. No entanto, a pressão seletiva exercida pela utilização de antimicrobianos também tem sido a principal força motriz por trás do surgimento e propagação de resistência aos medicamentos, características entre bactérias patogênicas e comensais (AAREWSTRUP et al., 2008).

O uso extensivo de antimicrobianos no controle e tratamento das infecções bacterianas e também utilizado como promotor de crescimento adicionado em rações animais é considerado uma das principais causas do aumento da resistência de micro-organismos a essas drogas (JOHN et al., 1997; GUSTAFON et al., 1997). A resistência surge como resultado das alterações genéticas determinadas por mutações cromossômicas ou por

aquisição de plasmídeo e subsequentes processos de seleção pelos agentes antimicrobianos (TRABULSI et al., 2005).

Nos Estados Unidos, um programa de vigilância do varejo de carne – Sistema Nacional de Controle de Resistência Antimicrobiana (NARMS) foi estabelecido em 1996, para monitorar a prevalência da resistência antimicrobiana entre as bactérias transmitidas por alimentos. Durante 2000-2008, laboratórios, vinculados ao NARMS, testaram 13.521 isolados de *E. coli* de carnes bovina e aves, para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) para medicamentos antimicrobianos essenciais na medicina humana e veterinária. A tendência de resistência, observada durante este período, variou em função dos agentes antimicrobianos. Por exemplo, a resistência durante 2000-2008 diminuiu ligeiramente para canamicina (16,1% para 10,2%), estreptomicina (77,5% para 54,6%), trimetoprim / sulfametoxazol (17,2% para 9,1%) e tetraciclina (68,4% para 47,4%). A cefoxitina aumentou de 7,4% em 2000 para 15% em 2006, e resistência à ceftriaxona aumentou de 6,3% para 13,5%. Resistência à ciprofloxacina permaneceu baixa (<1%) durante este período (DANIEL et al., 2012).

Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal - SINDAN (2009), os antibióticos são usados extensivamente em animais no Brasil; o montante gasto em medicamentos voltados à espécie bovina em 2009 foi o equivalente a cerca de um bilhão de dólares, mostrando a importância no controle e monitoramento no surgimento de cepas resistentes.

L. monocytogenes, bem como outras *Listeria* spp., são normalmente suscetíveis a uma ampla gama de antimicrobianos. No entanto, a evolução da resistência bacteriana frente aos antimicrobianos foi consideravelmente acelerada pela pressão seletiva exercida pelo excesso de prescrição de antimicrobianos em ambientes clínicos e à sua utilização como promotores de crescimento em animais de criação. Foram isoladas cepas de *L. monocytogenes* multi-resistentes de alimentos, do meio ambiente e de casos esporádicos de listeriose humana (CHARPENTIER et al., 1995). De acordo com Charpentier e Courvalin (1999) algumas cepas de *L. monocytogenes* já apresentam resistentes à tetraciclina, gentamicina, penicilina, ampicilina, estreptomicina, eritromicina, canamicina, sulfonamida, o trimetoprim e rifampicina.

Em um estudo realizado por Wang et al. (2013), na China, no período de 2008 a 2009 com 526 amostras de carnes de várias espécies, foram isoladas 65 cepas de *Listeria monocytogenes*, 72% apresentaram multirresistência frente a vários antimicrobianos testados, além de pertencerem aos sorovares epidemiologicamente importantes 1/2a e 4b, o que implica um risco potencial para a saúde pública. No Brasil, o gênero *Salmonella* apresenta resistência a muitos antibióticos e pode tornar-se um problema na medicina humana e veterinária (ZHAO et al., 2007). Em populações de bovinos onde agentes antimicrobianos são utilizados, sorotipos de *Salmonella* estão sob alta pressão de seleção, e já apresentam resistência a múltiplos antibióticos (DEFRANCESCO et al., 2004).

CAPÍTULO 2

2.1 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo são apresentados na forma de dois artigos científicos. O subtítulo deste capítulo corresponde aos artigos formatados de acordo com as orientações da Food Microbiology e International Journal of Food Microbiology, onde serão submetidos para publicação, respectivamente.

2.1.1 ARTIGO 1 – Phenotypic and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. and quantification of microorganisms in different steps of bovine slaughter in southern Brazil.

2.1.2 ARTIGO 2 – Phenotypic and genotypic diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from cattle carcasses in Southern Brazil.

Phenotypic and genotypic of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.

Phenotypic and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. and quantification of indicator microorganisms in different steps of bovine slaughter in southern Brazil

Márcia. R. Loiko^{a,*}, Cheila. M. D. De Paula^a, Ana. C. Langone^a, Rochele. Q. Rodrigues^a, Josete. B. Silveira^a, Luís. A. Nero^b, Milton. L. P. Espírito Santo^c, Eduardo. C. Tondo^a

^a Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

^b Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Departamento de Veterinária Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

^c Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, bovine carcass, virulence genes, antibiotic resistance.

*Corresponding Author. Mailing address: Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves, 9500, CEP: 43.212, Agronomia. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Tel: +55 51 3308-6677/+55 51 9977-2322. E-mail: marcialoiko@hotmail.com

ABSTRACT

Brazil is the largest exporter of red meat in the world and its maintenance in the international trade is directly linked to the safety of meat products. The investigation of microbial quality of carcasses and the accurate phenotypic and genotypic characterization of pathogens isolated inside slaughterhouses can provide important information about the potential sources of contamination and how to implement adequate control measures. This study aimed to evaluate the counts of indicator microorganisms and the phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* isolated from bovine carcasses sampled in three steps (P1, P2 and P3) of the process inside an exporter slaughterhouse in Southern Brazil. Of the total of 108 carcasses evaluated (6.48 %) were positive for *L. monocytogenes* serotypes 1/2a and 4b (3.70 %) were positive for *Listeria* spp. and (0.93 %) were positive for *Salmonella* Livingstone. P1 was the process step where the samples were collected on the leather of animals and where the largest number of pathogens was isolated. At this point, the counts of mesophilic microorganisms and *E. coli* ranged from 1.16 to 6.40 log CFU/cm² and from non-detectable (ND) to 3.32 log CFU/cm², respectively. In the other points, counts were significantly lower. *Salmonella* Livingstone presented resistance to nine antimicrobials and according to PCR result have *invA* and *sefA* genes, but not *spvC* gene. *L. monocytogenes* strains presented *hly* gene. The isolation of *L. monocytogenes* occurred in all sampling points, suggesting a potential risk of cross-contamination in the process.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, bovine carcass, virulence genes, antibiotic resistance.

1. Introduction

Currently, Brazil is the largest exporter of beef in the world, with solid food safety control measures implemented in exporter slaughterhouses, however several cases of foodborne diseases are still linked with beef consumption, mainly involving meat processed in not exporter slaughterhouses (Brazil, 2011).

Livestock represents the largest share of Brazilian agribusiness, with 208 million head of cattle. During the last years, this sector has demonstrated an expressive growth and improvements have been done in order to make Brazilian beef one of the best and safer worldwide. The State of Rio Grande do Sul (RS), in Southern Brazil, ranks sixth in the country in terms of cattle production, which corresponds to 11.5 million head of cattle (Agriculture Census of 2006). The exportation of Brazilian beef has increased significantly in recent years, from 20 % of total exports of beef in the world in 2006, and rising to 27 % in 2009 (FAO, 2009).

In 2010, Brazil produced over 9.1 million tons of meat, which exported 1.5 million. The volume, quality, regularity and competitive prices have consolidated Brazil as meat exporter to more than 180 countries (ABIEC, 2011). The maintenance in the international trade is directly linked to the quality and safety of Brazilian beef, highlighting the importance of the microbial quality and safety of meat products (Prata, 2009).

Indicator Microorganisms have been used by the meat industry in order to monitor and control the general hygiene conditions. Among them, mesophilic aerobic microorganisms, *E. coli* and *Enterobacteriaceae* are frequently used. Even though its investigation could be considered simple, the information regarding counts of these microorganisms can be useful for the meat industries, helping the process of decision making. In addition, the investigation of pathogenic microorganisms has also been indicated in order to monitoring the food safety of meat products. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* have been reported as some of the pathogens often associated with foodborne diseases involving red meat (Duffy et al, 2006). The slaughter process is complex and may contaminate red meat in different steps. Based on this, information about indicators and pathogenic microorganisms on beef carcasses

during different steps of slaughter is of great importance, however this kind of study is very difficult to conduct because industries generally do not permit sampling inside industrial plants, especially exporter ones. The evaluation of microorganisms and accurate characterization of pathogens in carcasses during process can provide important information about the sources of contamination and can be used to identify points of action for microbial control in slaughterhouses.

Based on that, the aim of this study was to evaluate the quantities of indicator microorganisms and the phenotypic and genotypic characteristics of pathogens isolated from three stages of the process of an exporter slaughterhouse in Southern Brazil, in order to identify possible control measures and interventions in the food safety point of view.

2. Materials and Methods

2.1. Characterization Industry

The Industry chosen to undertake the study lies in the upstate of RS, characterized by its facilities and installations, as a slaughterhouse which operates under Federal Inspection Service (SIF), with a slaughtering capacity of approximately 500 to 700 animals / day. The slaughterhouse was chosen because it was localized in the central region of the State of RS, receiving cattle from various regions of the State.

2.2. Sampling

In total, 108 cattle carcasses were sampled at three different points of the process, totalizing 324 samples analyzed. Sampling points were the follow: Point 1 (P1): after bleeding, when cattle remained with the skin, Point 2 (P2): after removing the skin, before evisceration and Point 3 (P3): after splitting the carcass before the shower toilet (Commission Regulation-EC, 2007). Carcasses were sampled using the sponge method, applied in the pectoral region, following international standards (Andrews et al., 1998). Each carcass was sampled using four sponges and each sponge was scrubbed vertically and ten times horizontally on a region of 100cm². In total, a 400cm² areas was sampled on each carcass. After collection, the four sponges were put inside a sterile

plastic bag, stored at 4° C and sent to the Laboratory of Food Microbiology and Food Control of the Institute of Food Science and Technology, of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS) where the microbiological analyzes were conducted.

2.2.1. Sample preparation

In the laboratory, the sponges were added to 200 ml of sterile peptone saline solution (0.85% NaCl + 0.1% casein peptone, Oxoid Ltd., Hampshire, England) and then homogenized in a Stomacher (Seward, New York, United States of America). Aliquots of 1 mL were taken and used for analysis of total count of mesophilic aerobic microorganisms and *E. coli* count.

For analysis of the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp., after the addition of 200 ml, the sponges from each sampling point were homogenized and three 40 ml aliquots were transferred to sterile tubes which were centrifuged at 1000 x g for 15 minutes. After this, the supernatants were discarded and the pellets were suspended in pre-enrichment media used for isolation and identification of these microorganisms described below.

2.3. Microbiological Analyses

2.3.1. Total count of aerobic mesophilic microorganisms (TCAM)

Based on ISO 4833:2003 method (ISO 2003), Petrifilm™ PCA plates were used to estimate the total count of mesophilic microorganisms at each point of each sample of bovine carcass. For this purpose, decimal dilutions were performed and dilutions were plated in duplicates.

Following the Official Methods of Analyses described by AOAC (1998), the plates were incubated in an incubator at 35° C for 48h. The red colonies were counted regardless of size or color intensity. The results were expressed as log colony forming units (CFU) per unit area (cm²).

2.3.2. *Escherichia coli* Count (EC)

Based on the ISO 21528 - 2:2004 protocol (ISO 2004), Petrifilm™ *E. coli* Count (ECC) plates were used to estimate the count of *E. coli*.

The *E. coli* populations were quantified in each sample point of each beef carcass. For this purpose, decimal dilutions were performed and all dilutions were plated in duplicates.

According to AOAC (1998), 1 ml of each solution contained in the sample container was inoculated on the Petrifilm surface, following the manufacturer's instructions. The Petrifilm were incubated in an incubator at 35° C for 48h. The blue colonies with gas production were counted as *E. coli*. The results were expressed as log CFU/cm².

2.3.2.1 Classification of Total mesophiles and *E. coli* counts (classes)

The values of the mesophiles and *E. coli* counts were characterized in classes. Class 1 was composed by counts ranged from not detectable (ND) to 1 log CFU/cm² and the quality of the meat sampled was considered excellent; class 2 was composed by counts between > 1 log to 2 log CFU/cm² (acceptable), Class 3 was comprised by values > 2 log to 3 log CFU/cm² (unsatisfactory), class 4 was comprised by values > 3 log to 4 log CFU/cm² (poor), Class 5 was composed by values between > 4 log to 5 log CFU/cm² (bad) and Class 6 was comprised by counts > 5 log CFU/cm² (deterioration).

2.3.3. Isolation and Identification of *Salmonella* spp.

Investigation of *Salmonella* spp. was performed as described in ISO 6579:2002 (ISO, 2002). The biochemical characterization was carried out using two to four typical colonies that were picked in Triple Sugar Iron Agar (TSI - Oxoid Ltd., Hampshire, England), Lysine Iron Agar (LIA - Oxoid Ltd., Hampshire, England), Citrate agar, Urea and Indol Broth which were incubated at 35-37 °C/18-24 hours. The suspected colonies of *Salmonella* spp., positive in the biochemical tests, were then plated on Brain Heart Infusion (BHI) agar (Oxoid Ltd., Hampshire, England) and subjected to serotyping with polyvalent antisera (Probac Brazil) for *Salmonella* spp. Strains confirmed as *Salmonella* spp. were sent to the Laboratory of *Enterobacteriaceae* of the Bacteriology Department of the Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ for serotyping confirmation.

2.3.4. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*

The investigation of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* was performed as described in ISO 11290-2 (ISO, 2002).

Three to five suspected colonies of *Listeria* sp. were transferred to Trypticase Soy Agar plates (TSA - Oxoid Ltd., Hampshire, England) supplemented with 0.6% yeast extract (TSA -YE 0.6%) (TSA - Oxoid, YE - Difco). The plates were incubated at 35-37 °C for 24-48 hours in order to obtain physiologically active colonies for carrying out biochemical tests. Characteristic *Listeria* sp. submitted to transmit light at 45 ° (Henry method) were subjected to biochemical identification. The biochemical tests were the follow: catalase, fermentation of carbohydrates, β -hemolysis, Voges-Proskauer (VP), Methyl Red (MR), Gram staining, motility test and CAMP test (MacFaddin, 2000).

After the biochemical testing, the suspected isolates of *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. were sent to the Laboratory of Bacterial Zoonoses, Department of Bacteriology of the Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, for antigenic characterization. This technique was based on agglutination "O" and "H" as recommended by Donker-Voet (1959) and Seeliger and Höhne (1979).

2.4 Microbiological parameters used

Salmonella spp. and *L. monocytogenes* were selected as pathogen indicators. *Escherichia coli* (EC) was used as indicator of hygiene and total mesophiles (TM) counts were used as general indicators of microbiological quality. The examined carcasses were considered contaminated when the count of a given parameter was equal or superior to the values set out in item 2.3.2.1 of this article and in case of pathogens by their presence.

The indicators are used to infer the sanitary-hygienic state of the beef carcass evaluated, because through them we can form a judgment about contamination by microorganisms and pathogenic indicators and assess the hygiene and sanitation state of foods available for consumption.

2.5. Molecular typing

2.5.1. Molecular analyses of *Salmonella* isolates

2.5.1.1. Multiplex-Polymerase Chain Reaction (PCR) - Detection of pathogenicity genes in *Salmonella* isolates.

The presence of virulence genes *invA*, *sefA* and *spvC* in *Salmonella* isolates were tested by multiplex-PCR in the Department of Veterinary of Federal University of Viçosa, under the coordination of Prof. Dr. Luis Augusto Nero. Primers used were described by Swamy et al. (1996), Woodward et al. (1996) and Swamy et al. (1996).

2.5.2. Molecular analyses of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp. isolates

2.5.2.1. Multiplex-PCR serotype identification of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp.

The serotype identification of *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. was carried out in the Department of Veterinary of Federal University of Viçosa, under the coordination of Prof. Dr. Luis Augusto Nero. The presence of *Imo* 1118, *Imo* 0737, *ORF* 2110, *ORF* 2819, *prs* and *hlyA* genes was investigated according Doumith et al. (2004) and Border et al. (1990).

2.6. Antimicrobial Resistance Testing

Listeria sp., *L. monocytogenes* and *Salmonella* sp. isolates were tested for antimicrobial resistance, according to the plate diffusion method as recommended by National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS / CLSI, 2012). Isolates *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. were confronted with the following antimicrobials: nalidixic acid (NAL 30µg), ampicillin (AMP 10µg), cephalothin (CFL 30µg), cefoxitin (CFO 30µg), cefotaxime (CTX 30µg), vancomycin (VAN 30µg), gentamicin (GEN 10mg), kanamycin (K 30 µg); streptomycin (EST 10 ug), amikacin (AMI 30µg), tobramycin (TOB 10 ug), erythromycin (ERY 15µg), tetracycline (TET 30µg), minocycline (MIN 30 µg), ciprofloxacin (CIP 5µg), imipenem (IPM 10 µg), chloramphenicol (CLO 30µg), clindamycin (CLI 2 µg), trimethoprim (TRI 5 µg) and sulphonamide (SUL 300µg). Since there are no standards or limits for the antimicrobials to be tested for *Listeria* sp., the limits used were those

established for *Staphylococcus* sp., as published by De NesF et al. (2010). A strain of *L. monocytogenes* ATCC 6477 was used as control.

Salmonella sp. Isolates were submitted to the following antimicrobials: ampicillin (AMP 10µg), cefoxitin (CFO 30µg), cephalothin (CFL 30µg), cefotaxime (CTX 30µg), imipenem (IPM 10µg), chloramphenicol (CLO 30µg), gentamicin (GEN 10µg), kanamycin (K 30µg), streptomycin (EST 10µg), amikacin (AMI 30µg), ciprofloxacin (CIP 5µg), nalidixic acid (NAL 30µg), tetracycline (TET 30µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT 25 µg) and Sulfonamida (SUL 300µg) (NCCLS/CLSI, 2012). A strain of *Escherichia coli* ATCC 8739 was used as a control.

2.7 Statistical Analyses

The microbial counts were expressed as Log Colony Forming Unit per square centimeter (Log CFU/cm²). The count data was submitted to Shapiro Wilk normality test (test w) to evaluate the distribution. The counts were compared using Wilcoxon-Mann-Whitney U test, because the sampling sites were random and mutually independent observations and variables have shown a continuous distribution. The microbial count data for the pathogens were transformed to proportions and compared by a Z test. The program used was Graphpad Prism 6.0, and significant differences were determined using confidence level ($p < 0.05$).

3. Results

3.1 Counts and isolation of microorganisms

Of the total of 108 carcasses evaluated, 10.19 % (11/108) were positive for *Listeria* spp. and 0.93 % (1/108) was positive for *Salmonella* sp. Among the positive samples for *Listeria* spp. 6.48 % (7/108) were *L. monocytogenes*, with four isolates identified as serotype 1/2a and three as 4b isolates (Table 1). Two strains of *L. innocua* serovar 6a and two *Listeria* sp. were also identified. The isolate of *Salmonella* sp. was serotype as S. Livingstone.

In relation to the assessed points, the P1 was the local where the largest number of isolates of pathogens was observed. Three strains of *L.*

monocytogenes, two of *L. innocua* and two of *Listeria* sp. were isolated in P1. In P2, three *L. monocytogenes* were isolated and, in P3, one *L. monocytogenes* and one *S. Livingstone* were isolated (Table 1).

One *L. monocytogenes* 1/2a isolated in P1 showed the same phenotypic and genotypic profile of a strain of *L. monocytogenes* 1/2a isolated in P3, indicating cross contamination. The other isolates of *L. monocytogenes* showed differences in relation to the pattern of antibiotic resistance, suggesting not be the same strain.

The count results found on every point for Total mesophiles (TM) and *E. coli* are shown in Table 1. The results of TM showed variable values between samples from 3.68 to 6.40; 1.79 to 4.46 and from 1.16 to 3.82 log CFU/cm² for P1, P2 and P3, respectively. The counts observed in P1 were statistically different from the counts observed on other points. Counts found in P1 were classified in classes 4 to 6, while counts of P2 and P3 were classified in classes 2 to 5 and 2 to 4, respectively.

The *E. coli* counts were variable, ranging from 0.52 to 3.32 log CFU/cm² in P1; ND to 2.01 and from ND to 0.46 log CFU/cm² in P2 and P3, respectively. The counts found in P1 and P2 were statistically different. At point 3, most results were ND.

3.2 Molecular Typing

The strain of *S. Livingstone* was positive for *InvA*, *sefA*, but negative for *SpvC* gene (Figures 03 and 04). All strains of *L. monocytogenes* were positive for *hlyA* gene (Table 02 and Figure 02). Through multiplex-PCR, two different serotypes were identified; i. e. *L. monocytogenes* 1/2a identified by the gene *IMO 0737* and serotype 4b identified by of ORF 2110 and ORF 2819 genes (Table 02 and Figure 01). One *L. innocua* was serotype as 6a.

4. Antibiotic Resistance

S. Livingstone showed resistance against six antimicrobials, i.e. ampicillin, clindamycin, cephalothin, ceftiofur, erythromycin and vancomycin.

Intermediate resistance to nalidixic acid and sensitivity compared to other antimicrobials, showing a multidrug resistance.

Regarding the resistance profile of *Listeria*, all strains were resistant to nalidixic acid and the majority of them showed resistance to cefoxitin (90.91%), clindamycin (90.91%), cephalothin (81.82%) and sulfonamide (54.55%) showing multiresistance (table 02). One strain of *L. monocytogenes* 4b showed resistance against eight antimicrobials, while the other two strains demonstrated to be resistant to four drugs, but presenting different profiles. One strain of *L. innocua* 6a was resistant to nine antimicrobials and one strain of *Listeria* sp. was resistant to eight drugs. The other *Listeria* sp. was resistant to five drugs (Table 02).

5. DISCUSSION

In this study, the bacterial counts for each process point analyzed showed variable values, being that there were statistically significant differences between the counts found in P1 compared with P2 and P3, but the same was not observed when comparing the counts of P2 and P3. One possible explanation for the high counts in the P1 samples may be that the sampling location was the leather and this is naturally contaminated due to dirt, feces, soil and dust (Gill et al., 2004; Lawrie, 2005). The lower counts at P2 and P3 may be justified due to the appropriate removal of the leather and the sampling location being the muscle tissue and the inside of the carcass, considered sterile (Gill, 1979), in addition to the appropriate practices. The quantification of viable microorganism population from the surfaces of the carcasses is commonly used to provide data indicating the hygiene level and care during slaughter operations, particularly in skinning and evisceration (Zweifel et al. 2003; Gill et al., 2003). The results of P1 and P2 are in accordance with other studies of bovine carcasses in various countries. For example, in Australia, Phillips et al. (2001) have analyzed 1275 bovine carcasses from exporter slaughterhouses and found an average of 2.42 log CFU/cm² of mesophiles, in the P1 relative to this study. Sumner et al. (2003), also in Australia, have investigated 523 carcasses of cattle in 13 very small slaughterhouses and found values of 1.82 log CFU/cm² for mesophiles. In Switzerland, Zweifel et al. (2005)

have evaluated 800 cattle carcasses and have reported averages counts ranging from 2.1 to 3.1 log CFU/cm² for mesophiles. In another study, Zweifel et al. (2008), also Switzerland examined 535 cattle carcasses in slaughterhouses of low capacity and found mesophilic counts ranging between 2.7 and 3.8 log CFU/cm². In opposite, an investigation conducted by França et al. (2006), in Brazil, has evaluated 160 half-carcasses of cattle and has demonstrated counts ranging between 4.7 to 4.5 log CFU/cm².

In the U.S. the microbiological standards used for acceptable aerobic mesophilic counts are below 10⁵ CFU/cm² in bovine carcass, indicating good hygiene during slaughter. Values similar to those were reported by Gill et al. (2000) in studies performed in slaughterhouses, in Canada. In opposite, different levels are considered acceptable by the decision 471/2001 of the European Union (EC, 2001), which considers acceptable levels of up to 3.5 log CFU/cm². Contamination of meat at levels above 10⁶ CFU/cm² indicates early deterioration process, producing typical odors and reduced shelf life (Gill, 1998; Evangelista 2001).

In this study, high counts of total mesophiles and *E. coli* were observed at P1, and the counts were classified as Class 4 to 6, indicating high levels of contamination. After removal the skin, the counts observed in P2 were reduced and were classified in classes 2 to 5 for mesophiles and 1 to 3 for *E. coli*, and at P3 there was a significant reduction in *E. coli* counts. Regarding international parameters for total coliforms and *E. coli* in meat, the Food Standards Agency (FSA, UK) (2002) considers satisfactory logarithmic mean counts of *E. coli* of ≤ 1.5 log CFU/cm², acceptable counts are those between 1.5 and 2.5 log CFU/cm² and not satisfactory the counts with more than 2.5 log CFU/cm². In Brazil, according to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), since 1997, the satisfactory *E. coli* counts are those ≤ 2 log CFU/cm² (Brazil 1997). Based on this, the *E. coli* counts demonstrated in P2 and P3 in the present study were below the limit established by the MAPA. These data corroborates to those reported by Jardim et al. (2006) who found 0.42 log CFU/cm² of *E. coli* in cattle carcasses after washing. In a similar study, Gill et al. (2000), in Canada, assessing the bacteriological conditions of 50 cattle

carcasses after the washing step and have demonstrated mean counts of 1.5 log CFU/100cm² for *E. coli*.

Studies have reported a low frequency of isolation of pathogens in foods of animal origin due to the presence of a microbiota with inhibitory potential (Nero et al., 2004). The hypothesis that high levels of microorganisms (> 10⁶ CFU/g) in food would exert an inhibitory effect on pathogenic microorganisms and that food with low levels of contamination allow the multiplication of pathogens (Jay, 2005) was not observed in this study in relation to strains of *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *Listeria* sp. *Listeria* strains were isolated in samples where there were high counts of total mesophiles (5.16 to 6.40 log CFU/cm²). According to Sofos et al. (2010) control of the slaughtering and processing of meat while maintaining a low microbial load, reduces the possibility of contamination and transmission of pathogens such as *L. monocytogenes* and *Salmonella*.

In this study, one strain of *S. Livingstone* was isolated at P3, after skinning and before refrigeration. This result is similar to other studies conducted in Brazil and other countries. As an example, Azevedo (2009), in Brazil, has analyzed 200 bovine carcasses and has shown the presence of *Salmonella* in 2 % the 155 these carcasses after washing, before refrigeration. Ransom et al. (2002), in the USA, found *Salmonella* spp. in 1.7% of the carcasses analyzed. On other hand, Rivera-Betancourt et al. (2004), in the USA, have reported about 25% of carcasses positive for *Salmonella*.

Even though only one carcass was contaminated with *Salmonella* in the present study, this result is considered out of the microbiological standard recommended by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) for fresh meat, RDC N^o 12 (Brazil, 2001) which requires the absence of *Salmonella* sp. in 25g of food.

The investigation of genes and their importance to bacteria and the study of their frequency in certain strains form the basis for future studies relating the genetic profile with the phenotypic profile, such as antimicrobial resistance, biochemical profile, among others. In the present study, the *S. Livingstone* presented the *invA* gene, and this result was similar to data demonstrated by

Rowlands (2008), in Brazil, where the *invA* gene was found in 100% of the *Salmonella* spp. isolated from meat products. Similar results were also obtained by Skyberg et al. (2006) and Li et al. (2006), but in the USA. Due to the large number of studies concerning this gene, and the frequency of 100% found in most of them, it is considered that the *invA* is conserved among *Salmonella* species and serovars, thus being considered a target gene for detecting *Salmonella* spp. (Oliveira et al. 2003). Some authors consider that the absence of *invA* gene in *Salmonella* strains in different serovars could cause a considerable reduction in the virulence of the microorganism because this gene is essential to full virulence because it triggers the invasion of the tissues (D'Aoust et al. 2007; Amini et al., 2010). According to a study by Hurt et al. (2011) the virulence of strains of *Salmonella* spp. is also related to the virulence plasmid that consists of five operon genes (*spvRABCD*) that enhances the systemic dissemination of the pathogen and assists in its reproduction in extra intestinal sites. However, the *spvC* gene was not detected in *S. Livingstone* in our study. In opposite, Kwag et al. (2008), Hur et al. (2011) and Bolton et al. (2011) have reported a high prevalence of the *spvC* gene in isolates of *Salmonella*. Craciunas et al. (2010) detected the *spvC* gene only in serovar *S. Enteritidis*, but not in serovar *S. Typhimurium*, *S. Cholerasuis*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum* and *S. Infantis*.

S. Livingstone was positive for the gene *sefA*, and this gene is responsible for the expression of fimbrial proteins. According to Craciunas et al. (2010) the study of fimbriae is very important, because they are responsible for the link between bacteria and host cells, mediating bacterial colonization and delivery of toxins. According to a study of Amini et al. (2011) the *sefA* gene is considered a target for determining the serovar *S. Enteritidis*. Craciunas et al. (2010) have reported that this gene has not been identified in other *Salmonella* serovars, which differs in this study.

The *S. Livingstone* showed resistance against six of the sixteen antimicrobials tested, (AMP, CLI, CFL, CFO, ERI and VAN), intermediate resistance to NAL and sensitivity to the other antibiotics (table 2). Ampicillin resistance was also detected by Zhao et al. (2007) analyzing 129 strains of *Salmonella* spp., being that 66 % of them were resistant to this antimicrobial. In

the study of Ye et al. (2011), strains of *Salmonella* spp. isolated from "in natura" meat were also resistant to antimicrobials. The vast majority showed resistance to at least two of the nine antimicrobials, including ampicillin, erythromycin, vancomycin, resistance results similar to those found in this study.

Resistance to cephalosporin is expected because it is a first generation cephalosporin with weak activity against Gram-negative bacteria, as observed by Spinosa et al. (2002) and also observed in this study. Salmonellosis is generally a self-limiting disease and, as such, antimicrobial therapy is not required, however, an infection caused by *Salmonella* strains resistant to antibiotics is a public health concern and its monitoring is important (Zou et al. 2012). The serotype S. Livingstone was the agent involved in human foodborne illnesses in Europe, Norway and Sweden (Guerin et al, 2004; CDC, 2010). In Norway were 44 reported cases where there were three deaths and 22 people hospitalized and in Sweden there were 16 cases but no deaths (Guerin et al., 2004).

In the present study were isolated seven strains of *L. monocytogenes* evaluated on three points (P1, P2, P3), two strains of *L. innocua* and two strains of *Listeria* sp. isolated only on P1. Slate et al. (1992) reported that the presence of *Listeria* species nonpathogenic to man, particularly of *L. innocua*, should not be underestimated inside a food industry. *L. monocytogenes* is the *Listeria* specie investigated in the context of food safety, however, the presence of other *Listeria* species can be interpreted as indicative of suitable conditions for the presence of pathogenic species (Vitas et al. 2004).

Of the seven strains of *L. monocytogenes*, four were classified as serotype 1/2a and three as 4b. Strains of *L. monocytogenes* serotype 4b were isolated at P2, after removing the skin. The even serotype 1/2a was isolated from P1 carcass, with skin and also from the P3 site of the half carcass prior to cooling. Through phenotypic and genotypic analyses of one of the strains of *L. monocytogenes* 1/2a found in P1, the same strain was also found on P3, indicating cross-contamination. According Gianfranceschi et al. (2009) *L. monocytogenes* serotypes 1/2a, 1/2b and 1/2c are mostly found in meat products and the slaughter environment. According Aarnisalo et al. (2003) the

most prevalent serotypes found in foods are 1/2a and 1/2b, which corroborates our study. A study by Wallace et al. (2003) also found in serovar 1/2a 90% of all isolates tested *L. monocytogenes* in food samples.

In relation to the isolates of *L. monocytogenes* 4b three main serotypes were identified, in P2. Hofer et al. (2000) in a study on identification of species and serotypes of 3.112 isolates of *L. monocytogenes*, from different origins and Brazilian States, held in collection for 26 years, reported that the most prevalent serotypes of *L. monocytogenes* in samples of human and meat products were 4b, 1/2a and 1/2b and in environmental samples serotype 1/2b were predominant. These results are similar to those by Vitas et al. (2004). These authors have identified the prevalence of serotypes 1/2a, 1/2b and 4b in meat products from Spain, besides these same serotypes are the most involved in human listeriosis, being responsible for over 90% of cases (Borucki et al. 2004; Doumith et al. 2004; Revazishvili et al. 2004). Among these three serotypes, strains of *L. monocytogenes* serotype 4b are most often involved in cases/outbreaks of foodborne human listeriosis (Farber et al. 1991; Cabrita et al. 2004). According to López et al. (2007), this observation supports the hypothesis that strains of serotype 4b have greater pathogenic potential than the other serotypes (1/2a and 1/2b). Doumith et al. (2004) also point out that 98% of 5.000 isolates obtained from foods and patients and analyzed by Listeria Reference Centre at the Pasteur Institute, France, belonged to the serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b.

According to Schmid et al. (2003) apparently there are geographical differences in relation to global distribution and isolation of certain serotypes of *Listeria*, for example, the serotype 4b predominates in Europe and the serotypes 1/2a and 1/2b predominate in Canada and the United States. The serotype 4b was the most involved in reported outbreaks in Europe and North America during the last two decades (Marakusha et al. 1996; Zhang et al. 2004) showing an incidence of 50% to 70% in cases of clinical infections in these countries (Chen et al., 2005; Zhang et al. 2004). In this study it was observed that serotype 4b and 1/2a were prevalent in the cattle carcasses analyzed.

Hofer et al. (2006) conducted a phenotypic analysis of strains of *L. monocytogenes* isolated during the years 1969 to 2000 (255 samples) in several regions of Brazil. It was observed that serotype 4b was the most frequent (60.3 %) followed by serotype 1/2a (29 %), highlighting yet the South and Southeast regions of the country as having the largest number of isolates of *L. monocytogenes* (87.8 %), suggesting that this fact should be related to different eating habits.

In Brazil there is a lack of information about this important pathogen and there is a need to intensify and deepen the investigation of *L. monocytogenes* so that one can identify the real importance of these pathogens in our environment (Cruz et al., 2008)

For some authors the presence of *L. monocytogenes* on carcasses is usually attributed to contamination by fecal matter during slaughter, estimated a high percentage (11-52%) of animals' healthy carriers (Rocourt, 1994). Some research on the occurrence of *Listeria* spp., including *L. monocytogenes* in meat processing plants also show the environment and equipment as sources of contamination of meat and meat products (Barros et al., 2004; Barbalho et al., 2005) which may suggest that this study contamination in carcasses by *L. monocytogenes* in P2 and P3 may be due to cross-contamination.

As for the profile of antimicrobial resistance, 100 % of the strains of *Listeria* were resistant to NAL, 90.91 % to CFO, 90.91 % to CLI, 81.82 % to CFL and 54.55 % were resistant to SUL showing multiresistance. The strains of *L. monocytogenes* serotype 4b showed resistance to various antibiotics, was resistant to all eight the antibiotics tested, of which showed resistance to GEN and EST and which according to CLSI (2008).

In a study conducted by Ruiz-Bolivar et al. (2012), using 17 antimicrobials and 108 strains of *L. monocytogenes*, over 90 % of the isolates were sensitive to erythromycin, chloramphenicol and vancomycin, and 65 % of the strains showed resistance to clindamycin, results that were different from those demonstrated in the present study where all strains of *L. monocytogenes* were resistant to clindamycin. According to Chen et al. (2010) the high clindamycin resistance in *Listeria monocytogenes* may be due to a mechanism

of resistance related to a clindamycin inactivating enzyme that modifies the antibiotic structure, which, according to Davis et al. (2009) is due to a possible modification of rRNA 23S of the microorganism.

In relation to isolates of *L. monocytogenes*, exhibited the *hlyA* virulence gene present in pathogenic strains and responsible for the infection cycle. All pathogenic strains of *L. monocytogenes* are hemolytic, and the hemolysin protein encoded by the gene *hly*, considered one of the main factors linked to virulence. The *hly* gene was the first virulence factor to be determined and sequenced in *L. monocytogenes*, being necessary for the survival and proliferation of the cells (Cruz et al., 2008).

One of the strains of *L. innocua* serotype 6a was resistant to nalidixic acid, amikacin, gentamycin, streptomycin, sulphazotrim, cefotaxime, clindamycin, cephalothin and ceftiofur, showing a multidrug front nine antimicrobials, and one strain of *Listeria* sp. showed resistance to eight that showed resistance to antimicrobials, they confirmed for the strain of *Listeria innocua* 6a, there is a difference only in relation to streptomycin and amikacin that this isolate was sensitive but was resistant to imipenem, showing a profile of multidrug resistance strains isolated from cattle carcasses.

In a study by Mantilla et al. (2008) in Brazil, using strains of *Listeria innocua* isolated from ground beef cattle, evaluated the antimicrobial resistance of these isolates front to fifteen antimicrobials and detected strains of *L. innocua* serotype 6a and 6b resistant to most antimicrobials tested, corroborating the multidrug viewed in this study.

Resistances levels of strains of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp. vary depending on the region studied and are influenced by antibiotic use in different countries. Therefore, it is necessary to control antimicrobial resistance of *L. monocytogenes* worldwide (Wang et al., 2013).

In conclusion, in this study we have demonstrated that the P1, where the animals remained with leather showed the highest counts of microorganisms, since it can be related to dirt bovine leather. The P2 and P3 counts for both mesophilic and for *E. coli* were within the national standards, showing that there

was a hygienic control within steps of slaughter. Regarding evaluated pathogens, isolation of *Salmonella* was at very low levels, but the isolation of a strain that has been reported outbreaks shows concern in relation to the pathogen.

Regarding the strains of *L. monocytogenes*, the isolation levels were higher and occurred in all sampling points, suggesting a potential risk of cross-contamination in the process. Regarding the resistance profile, this study shows that strains *Listeria* sp. are becoming multiresistant against the many antibiotics used to treat human infections, an alert to monitor the increasingly indiscriminate use of antimicrobials without control. Therefore, it can be suggested that strategies can be used to control cross-contamination during the slaughter process, using constant monitoring of surface cleaning and also control the management of the countryside and animals before slaughter.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was support by the project "Implementation of a Collaborating Centre for Agricultural Protection for Microbiological Risk Assessment in Animal Products (CDA-ARMPOA)"- CNPq/MAPA/SDA No.64/2008, coordinated by Prof. Dr. Bernadette D.G.M. Franco, University of São Paulo (USP) - Faculty of Pharmaceutical Sciences (Department of Food and Experimental Nutrition) who we would like to thank. We also would like to thank to the abattoir fridge for having provided the location for the collection of the samples. Our thanks to the Laboratory of Zoonoses of the Department of Bacteriology of the Institute Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) for helping with antigenic characterization and with the strains identification and typing.

REFERENCES

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Exportações por ano – 2011. Disponível em: < http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp.> Acesso junho de 2012.

AOAC – 1998. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (1998) xxth Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, AOAC SMPR.

Amini, K.; Salehi, T.Z.; Nikbahkht, G.; Ranjbar, R.; Amini, J.; Ashrafganjooei, S.B. 2010. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella*

Enteritidis isolated from human and animals in Iran. African Journal of Microbiology Research 4, 21, 2202-2210.

Andrews, W.; Hammack, T.S. 1998. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International.

Archer, D.L. 1996. *Listeria monocytogenes*: the science and policy. Food Control 7, 4/5, 181-182.

Azevedo, A.P. 2009. Prevalência e características de *Salmonella* spp em carne bovina brasileira para exportação: contribuição para uma avaliação de risco. (Dissertação). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ciências dos Alimentos.

Bacon, R. T.; Belk, K. E.; Sofos, J. N.; Clayton, R. P.; Reagan, J. O.; Smith, G. C. 2000. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. Journal of Food Protection 63, 8, 1080–1086.

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

Barros, M.A.F.; Beloti, V.; Haga, M.M.; Cavaletti, L.; D’ovidio, L.; Amorim, F.A.; Nero, L.A. 2004. *Listeria* spp.: ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 25, 4, 341-348.

Bolton, D.J.; O’Neill, C.J.; Fanning, S. 2011. A preliminary study of *Salmonella*, verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 and *Campylobacter* on four mixed farms. Zoonoses Pub Health. Article first published online September 27.

Borucki, M.K.; Reynolds, J.; Gay, C.C; Mcelwain, K.L.; Kim, S.H.; Knowles, D.P.; Hu, J. 2004. Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. Journal of Food Protection 67, 11, 2496-2499.

BRASIL. 2005. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio. Mundial e Brasil. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

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

BRASIL-1997. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 451, de 19 de Setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria Nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 dez. 2011.

Craciunas, C.; Keul, A.L.; Flonta, M.; Cristea, M. 2010. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hilA*, *agfA*, *spvC* and *sefC* genes. *Journal of Environmental Management*, 3, 1-4.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Investigation update: Multistate outbreak of human *Salmonella* Enteritidis infections associated with shell eggs. Available at <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis/>. Accessed December 2012

Cabrita, P.; Correia, S.; Dias, S.F.; Brito, L. 2004. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. *Systematic Applied Microbiology* 27, 454-461.

Charpentier, E.; Courvalin, P. 1999. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2103–2108.

Censo Agropecuário. 2006. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br> > Acesso: setembro. 2012.

Chen, B.Y.; Pyla, R., Kim, T.J.; Silva, J.L.; Jung, Y.S. 2010. Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish fillets and processing environment. *Lett Appl Microbiol* 50, 626–632.

Cruz, C.D.; Martinez, M.B.; Destro, M.T. 2008. *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alim. Nutr.*, Araraquara, 19, 2, 195-206.

Davis, J.A.; Jackson, C.R. 2009. Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. *Microb Drug Resist* 15, 27–32.

De Nes, F.; et al. 2010. Molecular analysis on *Listeria monocytogenes* in dairy products *Rev Soc Bras Med* 43 (4), 382-385.

Donker-Voet, J.A. 1959. Sorological Study on Some Strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. *American Journal of Veterinary Research* 20, 176-179.

Doumith, M.; Buchrieser, C.; Glaser, P.; Jacquet, C.; Martin, P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 8, 3819-3822.

D'aoust, J.Y.; Maurer, J. *Salmonella* species. 2007. In: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R. *Food Microbiology: Fundamentals and Fontiers*. 3.ed. Washington: ASM Press.

EC – European Community – Commission Regulation n. 471/2001. *Official Journal of the European Union* 165, 48-53.

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

- Evangelista, J. 2001. Tecnologia de alimentos. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.652.
- Farber, J.M.; Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. Microbiological Reviews 55, 3, 476-511.
- França Filho, A.T.; Mesquita, A.J.; Oliveira, J.P.; Bueno, C.P.; Lopes, J.H., Couto, M.V., Borges, N.M.F., 2006. Qualidade bacteriológica de miás-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. Ciência Animal Brasileira 7, 3, 315-325.
- Gebreyes, W.A.; Thakur, S.; Dorr, P.; Tadesse, D.A.; Post, K.; Wolf, L. 2009. Occurrence of *spvA* virulence gene and clinical significance for multidrug-resistant *Salmonella* strains. Journal of Clinical Microbiology 47, 3, 777-780.
- Gianfranceschi, M.V.; et al., 2009. Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002–2005). Food Microbiology 26, 520–526.
- Gil, J.I. 2002. Manual de Inspeção Sanitária de carnes. 2ed. Portugal: Fundação Caloust Gulbenkian, 485.
- Gill, C.O.; Deslandes, B.; Rahn, K.; Houde, A. Bryant, J. 1998. Evaluation of the hygienic performances of the processes for beef carcass dressing at 10 packing plants. Journal of Applied Microbiology, Oxford, 84, 6, 1050-1058.
- Gill, C.O., Bryant, J., McGinnis, J.C., 2000. Microbial effects of the carcass washing operations at three beef packing plants. Fleisch-wirtsch. Int. 3, 46–48.
- Gill, C.O.; Jones, T.; Bryant, J.; Brereton, D. A., 2000. The microbiological conditions of the carcasses of six species after dressing at a small abattoir. Food Microbiology 17, 233-239.
- Gill, C.O.; Landers, C., 2004. Microbiological conditions of detained beef carcasses before and after removal of visible contamination. Meat Science 66, 335-342.
- Guerin, P.J.; De Jong, B.; Heir, E.; Hasseltvedt, V.; Kapperud, G.; Styrmo, K.; Gondrosen, B.; Lassen, J.; Andersson, Y.; Vitsland, P.A.A., 2004. Outbreak of *Salmonella* Livingstone infection in Norway and Sweden due to contaminated processed fish products. Epidemiol. Infect. 132, 889–895.
- Hofer, E.; Ribeiro, R.; Feitosa, D.P., 2000. Species and Serovars of the Genus *Listeria* Isolated from Different Sources in Brazil from 1971 to 1997. Memórias do Inst. Oswaldo Cruz 95, 5, 615-620.
- Hofer, E.; Reis, C.M.; Hofer, C.B. 2006. Sorovars of *Listeria monocytogenes* and related species isolated from human clinical specimens. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39, n.1, 32-37.
- Jardim, F.B.B.; Silva, E.N.; Okura, M.H.; Ramos, M.A., 2006. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.2, n.26, p.277-282.

- Jay, J.M. 2005. Modern Food Microbiology. Maryland: Aspen, 6ed, 679.
- Kwag, S.I.; BAE, D.H.; CHO, J.K. et al., 2008. Characteristics of persistent *Salmonella* Enteritidis strains in two integrated broiler chicken operations of Korea. J Vet Med Sci 70, 1031–1035.
- Hur, J., Kim, J.H.; Park, J.H. et al. 2011. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. Vet J.189, 306–311.
- ISO. 2002. - International Organization for Standardization ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO-2002-International Organization for Standardization, ISO 11290-1 and 11290-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes*.
- McFaddin, J.F., 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria.3. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. 43, 544-545.
- ISO 21528-2:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae-Part 2: Colony-count method.
- ISO 4833:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Colony-count technique at 30 degrees C.
- Li, Q.; Skyberg, J.A.; Fakhr, M.K.; Sherwood, J.S.; Nolan, L.K.; Logue, C.M., 2006. Antimicrobial susceptibility and characterization of *Salmonella* isolates from processed bison carcasses. Applied Environment Microbiology 72, 4, 3046-9.
- López, V.; Martínez-Suárez, J.V.; Ortiz, S.; Corujo, A.; López, P.; Navas, J.; Moreno, R., 2007. Traceback identification of an ingredient (Pork Dewlap) as the possible source of *Listeria monocytogenes* serotype 4b contamination in raw chicken products. Journal of Food Protection 70, 6, 1513-1517.
- Madden, R.H.; Espie, W.E.; Moran, L.; McBride, J.; Scates, P., 2001. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in northern Ireland. Meat Science 58, 4, 343-346.
- Mantilla, S.P.S.; Franco, R.M.; Oliveira, L.A.T.; Santos, E.B.; Gouvêa, R., 2008. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, 45, 2, 116-121.
- Martínez, B.; Celda, M.F.; Millán, M.E.; Espacio, A.; Cano, M.; López-Mendoza, M.C., 2009. Assessment of the microbiological conditions of red-meat carcasses from bacterial counts recovered by sampling via excision or

swabbing with cotton wool. International Journal of Food Science and Technology 44, 770-776.

Marakusha, B.; Darwich, K.; Tartakovskii, I., 1996. Characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated in Russia and their typing using pulse electrophoresis. Zhurnal Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 3, 60-64.

National Committee for Clinical Laboratory Standards International – CLSI/NCCLS, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100 – S21, vol.31, N^o1. January 2012 .CLSI, Wayne, PA, USA.

Nero, L.A.; Mattos, M.R.; Beloti, V.; Netto, D.P.; Pinto, J.P.A.N.; Nélio, J.A.; Silva, W.P.; Franco, B.D.G.M., 2004. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. Brazilian Journal of Microbiology 35, 3, 211-215.

Oliveira, S.D.; Rodenbusch, C.R.; Michael, G.B.; Cardoso, M.I.R.; Canal, C.W.; Brandelli, A. 2003. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. Brazilian Journal of Microbiology 34, 1, 123-124.

Prata, C.B. et al., 2009. A possível presença de *E. coli* O157:H7 em dejetos e carcaças de bovinos. Revista Nacional da Carne 383, 88-93.

Phillips, D.; Sumner, J.; Alexander, J.; Dutton, K., 2001. Microbiological quality of Australian beef. Journal of Food Protection 64, 5, 692-96.

Ransom, J.R.; Belk, K.E.; Bacon, R.T.; Sofos, J.N.; Scanga, J.A.; Smith, G.C., 2002. Comparison of sampling methods for microbiological testing of beef animal rectal clonal feces hides and carcasses. Journal of Food Protection 65, 621-626.

Rowlands, R.E.G., 2008. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de virulência em cepas de *Salmonella* spp isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares. (Dissertação). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ciências dos Alimentos.

Rivera-Betancourt, M.; Shackelford, S.D.; Arthur, T.M.; Westmoreland, K.E.; Bellinger, G.; Rossman, M.; Reagan, J.O.; Koohmaraie, M., 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. Journal of Food Protection 67, n.2, 295-302.

Revazishvili, T.; Kotetishvili, M.; Stine, O.C.; Kreger, A.S.; Morris, J.G.; Sulakvelidze, A., 2004. Comparative analysis of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for characterization *Listeria monocytogenes* strains isolated from environmental and clinical sources. Journal of Clinical Microbiology 42, 1, 276-285.

Rocourt, J. 1994. *Listeria monocytogenes*-The state of the science. Dairy Foods Environm. Sanit. 14, 70-82.

Skyberg, J.A.; Logue, C.M.; Kolan, L.K., 2006. Virulence Genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. *Avian Diseases* 50, n.1, 77-81.

Schmid, M., Walcher, M., Bubert, A., Wagner, M.; Wagner, M., Schleifer, K. 2003. Nucleic acid-based, cultivation-independent detection of *Listeria* spp. and genotypes of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 35, 215-225.

Spinosa, H.S.; Górnjak, S.L.; Bernardi, M.M., 2001. Beta-Lactam antibiotics: penicillins and cephalosporins. In: *Applied Pharmacology for Veterinary Medicine*. 3th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 752.

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

Sumner, J. et al., 2003. Microbial contamination on beef and sheep carcasses in South Australia. *International Journal of Food Microbiology* 81. 3, 255-260.

Slade, P.J. 2002. Monitoring *Listeria* in the food production environment. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. *Food Research International* 25, 45-56.

Swamy, S.C; Barnhart, H.M; Lee, M.D; Dreesen, D.W., 1996. Virulence determinants *invA* and *spvC* in salmonella isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 3768-3771.

Ye, Y.; Wu, Q.; Zhang, J.; Lu, J.; Lin, L., 2011. Isolation of *Salmonella* from meat samples and characterization by enterobacterial repetitive intergenic consensus–Polymerase Chain Reaction and antibiotics test. *Short Communications-Foodborne Pathogens and Disease* 8, 8.

Zhang W, Jayarao B, Knabel S., 2004. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl Env Microbiol.*70, 913-920.

Woodward, M.J; Kirwan, S.E.S., 1996. Detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs by the polymerase chain reaction. *The Veterinary Record*, 411-413.

Wallace, F.M., Call, J.E., Porto, A.C.S., Cocoma, G.J., 2003. ERRC Special Projects Team and prepared frankfurters during extended refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, v.66, 1, p. 584-591.

Luchansky., J.B., 2003. Recovery rate of *Listeria monocytogenes* from commercially

Vitas, A. I.; Aguado, V.; Garcia-Jalon, I., 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 90, 349-356.

Zhao, S.; Mcdermott, P.F.; White, D.G.; Qaiyumi, S.; Friedman, S.L.; Abbott, J.W.; Glenn, A.; Ayers, S.L.; Post, K.W.; Fales, W.H.; Wilson, R.B.; Reggiardo, C.; Walker, R.D., 2007. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. *Veterinary Microbiology* 123, 122-132.

Zou, M.; Keelara, S.; Thakur, S., 2012. Molecular Characterization of *Salmonella* enterica Serotype Enteritidis Isolates from Humans by Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Foodborne Pathogens and Disease* 9, 3.

Zweifel, C.; Baltzer, Stephan, D. R., 2005. Microbiological contamination of cattle and pig carcasses at five a abattoirs determined by swab sampling in accordance with EU Decision 2001/471/EC. *Meat Science*, v.69, n.3, p.559-566.

Zweifel, C.; Stephan, R., 2003. Microbiological monitoring of sheep carcass contamination in three Swiss abattoirs. *Journal of Food Protection*, Ames, 66, 6, 946-952.

Zweifel, C.; Fischer, R.; Stephan, R., 2008. Microbiological contamination of pig and cattle carcasses in different small-scale Swiss abattoirs. *Meat Science*, Barking 78, 3, 225-231.

Figures:

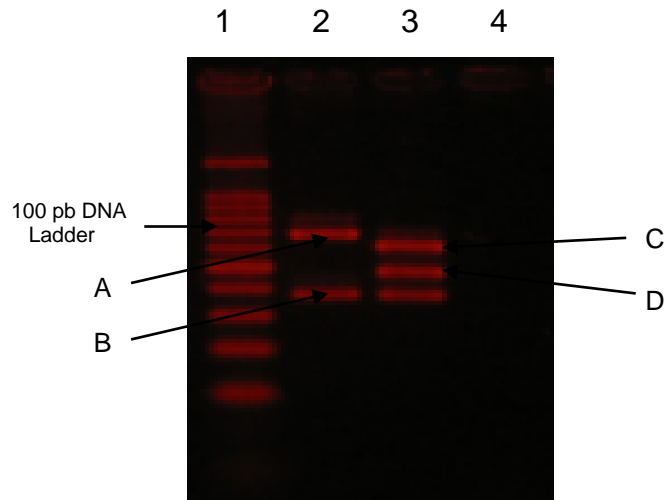


Figure 01: Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by multiplex PCR of strains of *Listeria monocytogenes* isolated from bovine carcass. Line 1-molecular weight marker, Line 2-1/2a strain (isolated A7P1); line 3-4b strain (isolated A2P2); line 4-negative control. Letters: A-IMO 0737 gene (691 bp – serotype 1/2a); B- *prs* gene (370 bp – Genera *Listeria* spp.); C- ORF 2110 gene (597 bp – serotype 4b); D-ORF 2819 (471 bp – serotype 4b);

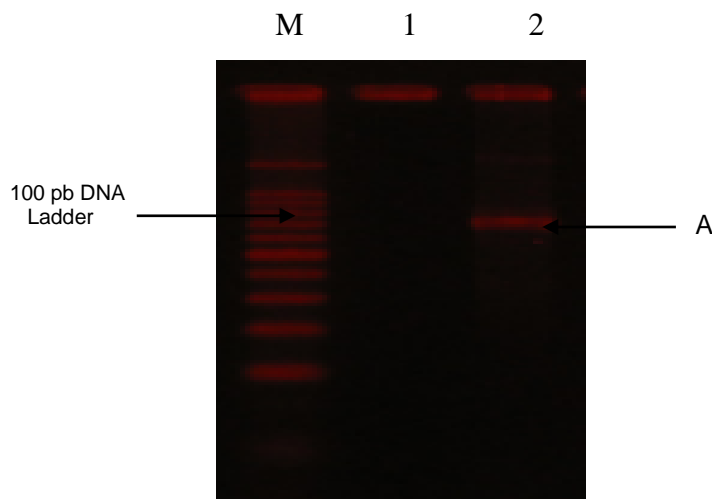


Figure 02: Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by PCR of strains of *Listeria monocytogenes* isolated from bovine carcass. M: molecular weight marker; 1, negative control; 2, *Listeria monocytogenes* (isolated A2P2). Letter: A- *hlyA* gene (702 bp).

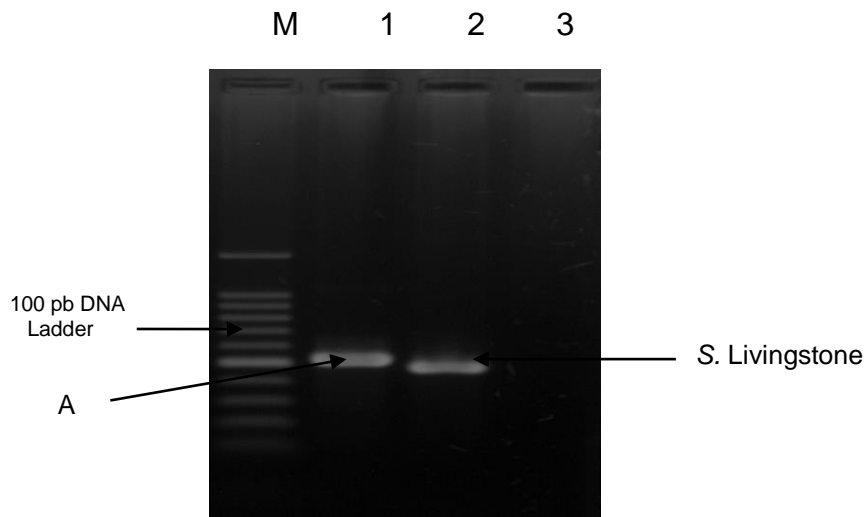


Figure 03: Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by PCR strain of *S. Livingstone* isolated from bovine carcass. M: molecular weight marker, 1: positive control (*InvA* gene); 2: Sample *S. Livingstone* (positive), 3: negative control. Letter: A – *InvA* gene (521 bp).

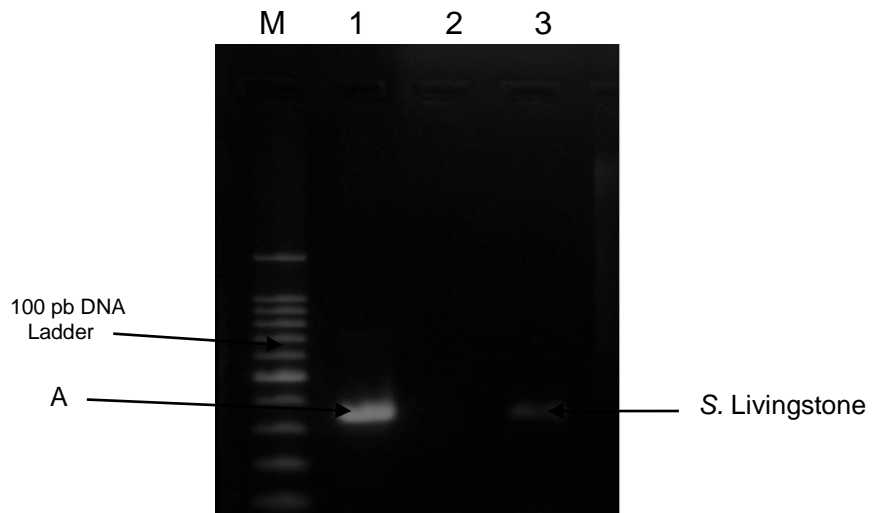


Figure 04: Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by PCR strain of *S. Livingstone* isolated from bovine carcass. M: molecular weight marker, 1: positive control (gene *sefA*), 2: negative control; 3: Sample *S. Livingstone* (positive). Letter: A – *sefA* gene (310 bp).

Tables

Table 1. Counts of total mesophylls microorganisms (MT), *E. coli* and presence of *Salmonella* spp., *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* isolated in three steps of a bovine slaughter process in Southern Brazil.

Microorganisms	O1	*Class	O2	Class	O3	Class	O4	Class	O5	Class	O6	Class	Total	
MT (log CFU/cm ²)	P1	5.29 ± 0,23 ^a	6	3.68 ± 1,37 ^c	4	5.16 ± 0,77 ^a	6	3.99 ± 0,39 ^c	4	5.38 ± 0,38 ^a	6	6.40 ± 0,22 ^e	6	-
	P2	2.59 ± 0,34 ^b	3	2.57 ± 0,53 ^b	3	2.21 ± 0,96 ^b	3	1.79 ± 0,55 ^d	2	3.78 ± 0,60 ^c	4	4.46 ± 0,18 ^a	5	-
	P3	2.29 ± 0,90 ^b	3	2.14 ± 0,59 ^b	3	1.43 ± 1,12 ^d	2	1.16 ± 1,02 ^d	2	2.93 ± 1,31 ^b	3	3.82 ± 0,15 ^c	4	-
<i>E. coli</i> (log CFU/cm ²)	P1	2.84 ± 0,31 ^a	3	1.91 ± 0,82 ^c	2	2.38 ± 1,12 ^e	3	0.52 ± 0,99 ^f	1	2.98 ± 0,31 ^a	3	3.32 ± 0,41 ^h	4	-
	P2	ND	1	0.56 ± 0,50 ^d	1	0.20 ± 0,38 ^b	1	0.09 ± 0,27 ^b	1	0.98 ± 0,79 ^g	1	2.01 ± 0,28 ^c	2	-
	P3	ND	1	0.46 ± 1,06 ^b	1	ND	1	0.10 ± 0,29 ^b	1	ND	1	ND	1	-
<i>L. monocytogenes</i> (presence/cm ²)	(4/10)	-	(0/10)	-	(3/25)	-	(0/31)	-	(0/15)	-	(0/17)	-	(7/108)	
<i>L. innocua</i> (presence/cm ²)	(2/10)	-	(0/10)	-	(0/25)	-	(0/31)	-	(0/15)	-	(0/17)	-	(2/108)	
<i>Listeria</i> sp (presence/cm ²)	(0/10)	-	(0/10)	-	(0/25)	-	(0/31)	-	(0/15)	-	(2/17)	-	(2/108)	
<i>Salmonella</i> spp. (presence/cm ²)	(0/10)	-	(0/10)	-	(1/25)	-	(0/31)	-	(0/15)	-	(0/17)	-	(1/108)	

Classes: Class 1 (ND to 1 log CFU/cm² = excellent), class 2 (> 1 log to 2 log CFU/cm² = acceptable), class 3 (> 2 log to 3 log CFU/cm² = unsatisfactory), Class 4 (> 3 log to 4 log CFU/cm² = poor), class 5 (>4 log to 5 log CFU/cm² = bad) and Class 6 (> 5 log CFU/cm² = deterioration). Standard deviation was not considered to classify counts. Point: P1 – Point 1 (cattle with the skin); P2 – Point 2 (after removing the skin); P3 – Point 3 (before evisceration) and. ND: Not Detectable.

Table 02. Identification the species, serotype, gene profile and resistance profile of *Listeria* spp. isolated from bovine carcasses of southern Brazil.

Sample identification	Specie	serotype	Gene profile					Resistance profile
			<i>hlyA</i>	<i>prs</i>	ORF 2110	ORF 2819	<i>lmo</i> 0737	
A1P1	<i>L. innocua</i>	6a	-	+	-	-	-	NAL-CLI-CFO
A9P1	<i>L. innocua</i>	6a	-	+	-	-	-	NAL-AMI-GEN-EST-SUL-CTX-CLI-CFL-CFO
A7P1	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	+	+	-	-	+	NAL-SUL-CTX-CLI-CFO
A10P1	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	+	+	-	-	+	NAL-CTX-CLI-CFO
A13P1	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	+	+	-	-	+	NAL-CTX-CLI-CFO-K-TOB
A7P3	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	+	+	-	-	+	NAL-SUL-CTX-CLI-CFO
A2P2	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+	+	+	+	-	NAL-AMI-GEN-EST-SUL-CTX-CLI-CFL
A5P2	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+	+	+	+	-	NAL-CTX-CLI-CFO
A14P2	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+	+	+	+	-	NAL-CTX-CFO-TOB
A3P1	<i>Listeria</i> sp.	-	-	+	-	-	-	NAL-TET-SUL-CTX-CLI-CFL-IPM-CFO
A6P1	<i>Listeria</i> sp.	-	-	+	-	-	-	NAL-SUL-CTX-CLI-CLO

Phenotypic and genotypic of *Escherichia coli* O157:H7

Phenotypic and genotypic diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from cattle carcasses in Southern Brazil

Márcia R. Loiko^{a*}, Cheila M. D. de Paula^a, Ana C. J. Langone^a, Josete B. Silveira^a, Paulo M. Roehe^b, Samuel Cibulski^b, Fabiana Q. Mayer^c, Milton L. P. E. Santo^d, Eduardo C. Tondo^a

^a Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

^b Laboratório de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

^c Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

^d Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, bovine carcasses, Molecular typing, PFGE, Cytotoxicity, Resistance patterns, Southern Brazil.

***Corresponding Author. Mailing address:** Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves, 9500, CEP: 43.212, Agronomia. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Tel: +55 51 3308-6677/+55 51 9977-2322. E-mail: marcialoiko@hotmail.com

ABSTRACT

Meat and meat products have been identified as food vehicles of *Escherichia coli* O157:H7 in many foodborne outbreaks worldwide. In Southern Brazil, to date, no events on contamination of such products or foodborne illness associated to *E. coli* O157 H7 have been reported. The present study aimed to investigate the phenotypic and genotypic diversity of *E. coli* O157:H7 isolated from cattle leather and carcasses in a slaughterhouse in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. One hundred and eight leather and cattle carcasses were sampled in three different steps of slaughter line. *E. coli* O157:H7 was isolated from 22 out of 108 bovine carcasses. The isolates were analyzed and typified with multiplex-PCR (*eae*, *stx1* and *stx2* genes), PFGE macro-restriction, cytotoxicity analysis and sensitivity to antimicrobials analysis. Multiplex-PCR identified four patterns, while PFGE allowed grouping the strains into six patterns. Twenty one strains (95.45 %) were verotoxic. Antimicrobial sensitivity revealed seven distinct resistance patterns and six multi-resistant strains. Considering all the methods used to typify the strains, ten general profiles (I to X) were identified. Profile I comprised most (n=8) of the isolated strains. Four strains displayed profile II; three presented a type IV and VI profile, while each of the other four strains was characterized as a distinct profile. Strains displaying profile VI presented the same phenotypic and genotypic characteristics of *E. coli* O157:H7 responsible for a foodborne outbreak that occurred in Argentina in 2005. To the knowledge of the authors, this is the first study demonstrating the isolation and characterization of *E. coli* O157:H7 in Southern Brazil.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, bovine carcasses, molecular typing, PFGE, Cytotoxicity, Antibiotic resistance, Brazil.

1. Introduction

Escherichia coli O157:H7 is a bacterial pathogen of major importance and has been involved in a number of serious foodborne disease outbreaks in several countries in recent years (Ateba-Mbewe, 2011; Lanier et al., 2011; CDC, 2012; Etcheverría & Padola, 2013). *E. coli* O157:H7 has the potential to cause illness in humans, ranging from mild non-bloody diarrhoea to more severe and life threatening conditions like haemorrhagic colitis (HC) and haemolytic uremic syndrome (HUS) (Karmali, 1989; Hussein, 2007). Although it has been isolated from many types of foods, meat and meat products have been the most common contamination vehicles of this pathogen (Barlow et al., 2006; Etcheverría et al., 2010).

Many animal species can be asymptomatic *E. coli* O157:H7 carriers; however, cattle have been recognized as its main reservoir (Kaper et al., 2004; Money et al., 2010). *E. coli* O157:H7 transmission can be achieved by faecal-oral route, person-to-person contact or by contact with infected animals (Bell et al., 1994; Rivas et al., 2008). The infectious dose may be less than 10 viable cells (Feng & Monday, 2000); therefore even processed foods may contain sufficient bacteria to cause disease. Furthermore, *E. coli* O157:H7 is able to resist to stressful conditions commonly found in foods, which increases its potential risk (Fu et al., 2003).

Little is known about *E. coli* O157:H7 frequency in meat or meat products in Brazil. The involvement of these pathogens in foodborne outbreaks or cases has not been reported in that country, but some evidence exists on the occurrence of hemolytic uremic syndrome (HUS) for more than a decade (Guth et al., 2002; Irino et al., 2002; Vaz et al., 2004; Nishimura et al., 2005; Souza et al., 2011). Argentina borders Rio Grande do Sul and has the highest prevalence of HUS cases in children below four years of age (Rivas et al., 1998; 2003; 2006). As in that country, Southern Brazil has one of the highest rates of beef consumption in the world (about 50 kg/person/year). Thus, information about contamination frequencies with *E. coli* O157:H7 in animal products becomes an important research issue. This study aimed to estimate the frequency of *E. coli* O157:H7 in meat and leather from cattle sent for slaughtering in Rio Grande do Sul, Brazil and to investigate phenotypic and genotypic diversity of the isolated strains.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

Samples were collected from 108 animals, at three points of the slaughtering process: Point 1 (P1) = hide after bleeding; Point 2 (P2) = carcasses after hide removal but before evisceration; and Point 3 (P3) = carcasses immediately after division into two parts. The total number of samples was 324. Sample collection was performed by surface swabbing, as described by Andrews and Hammack (1998). At each sampling point, four sterile sponges moistened with 20 mL saline peptone solution (0.85 % NaCl and 0.1 % casein peptone, Oxoid - England) were applied to four areas of 100 cm², using a swabbing template. After rubbing ten times vertically and ten times horizontally, sponges were placed in the same sterile plastic bag, and kept at 4 °C. The samples were transported to the laboratory and tested immediately.

2.2 *Escherichia coli* O157:H7 isolation

E. coli O157:H7 isolation was performed according to International Standard – ISO 16654:2001. Sterile peptone saline solution (200 mL) was added to each bag and placed in a Stomacher (Seward, USA) at low speed for removal of the material adhered to the sponges. The suspension (25 mL) was mixed with 225 mL of Modified Tryptone Soy Broth (Oxoid, England) containing 0.45 mg novobiocin (Laborclin, Brazil) and incubated at 41.5 °C for 18-24 hours. For microorganisms concentration by immunomagnetic separation (IMS), immunomagnetic particles (Dynabeads, Invitrogen, USA) coated with anti-O157 antibodies were used. Cefixime tellurite sorbitol MacConkey agar and Sorbitol MacConkey agar (both Oxoid, England) were used for isolation. Sorbitol-negative colonies of each isolate were characterized by biochemical tests, indol analysis, beta-glucuronidase analysis and agglutination with *E. coli* O157 antiserum (Probac, Brazil). The identification was confirmed with a commercially kit [Molecular Detection System (MDS); 3MTM, USA].

2.3. DNA extraction

Genomic DNA was extracted by heat treatment as previously described by Paula et al. (2010). One colony of each isolate was inoculated into 3 mL of BHI broth (Oxoid, England) and incubated overnight at 37 °C. After this period, 1 mL of bacterial suspension was centrifuged at 5000 x g for 4 min at room

temperature. The supernatant was discarded and the pellet was suspended in 1 mL of TE buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDA pH 8.0). This step was repeated twice. The pellet was suspended in 100 µL of TE, kept at 95 °C for 10 minutes and centrifuged at 14000 x g for 20 sec. The supernatant was used in multiplex-PCR reactions.

2.4. Multiplex-PCR

Primers used in this study detect *eaeA*, *stx1* and *stx2* genes in a multiplex reaction and have been previously described by Paton & Paton (1998). Primers sequences are: *eaeA*-F (5'-GACCCGGCACAAGCATAAGC-3') and *eaeA*-R (5'-CCACCTGCAGCAACAAGAGG-3'), 384 bp amplicon; *stx1*-F (5'-ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC-3') and *stx1*-R (5'-AGAACGCCCACTGAGATCATC-3'), 180 bp amplicon; *stx2*-F (5'-GGCACTGTCTGAAACTGCTCC-3') and *stx2*-R (5'-TCGCCAGTTATCTGACATTCTG-3'), 255 bp amplicon.

Each PCR (40 µL) consisted of 10 µL of genomic DNA, 0.5 mM of each primer, x 1.00 µL of Taq PCR Master Mix (Invitrogen, USA) and 24.1 µL of PCR grade water. Amplification conditions were 35 cycles with 1 min denaturation at 95°C; 2 min annealing at 65°C for the first 10 cycles, decreasing to 60°C by cycle 15; and 1.5 min elongation at 72°C, increasing to 2.5 min from cycles 25 to 35. PCR products were visualized by electrophoresis in 1.5 % (w/v) agarose gels, stained with ethidium bromide, and examined under ultraviolet illumination. *E. coli* strain ATCC 8739 was used as negative control; *E. coli* strain O157:H7 - INCQS 00171 (C2) and *E. coli* O157:H7 strain isolated of an outbreak from Argentina (C1) were used as positive controls.

2.5. *Escherichia coli* O157:H7 genetic characterization

The isolates were submitted to molecular typing by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) using the PulseNet protocol (Ribot et al., 2006). Bacterial cells were suspended in suspension buffer, and cell density was adjusted to turbidity reading of 0.48 to 0.54. Proteinase K was added to a final concentration of 1 mg/mL, and 500 µL of cell suspension was added to 500 µL of 1 % SeaKem agarose. 400 µL of agarose mixture was pipetted into plug moulds (Bio-Rad, USA). Solidified agarose plugs were transferred to a tube

containing 5 mL of lysis buffer and 20 µL of proteinase K (20 mg/mL) and incubated in a shaking water bath at 54 °C for 2 hours. Plugs were washed twice with type-1 water for 15 min and four times with 0.01 M Tris-EDTA for 15 min in a shaking water bath. Agarose-embedded DNA plugs were restricted with 30 U of *Xba*I (Roche Molecular Biochemical, USA) for 2 h at 37 °C. The digested DNA plugs were loaded on the comb of a 1 % SeaKem agarose gel and electrophoresed in a CHEF DR III apparatus (Bio-Rad, USA) with switch times of 2.2 to 54.2 sec at 6 V/cm for 18 h at 14 °C. Gels were stained with ethidium bromide (1 mg/mL) and destained with two deionized water washes. Visualization and gel imaging were performed on Image Quant 300 imager (Bio-Rad).

PFGE results were analysed using BioNumerics software (Applied Maths, Belgium). Banding pattern similarities were compared using one-enzyme analysis with 1.5 % band position tolerance. An international standard *Salmonella Braenderup* strain (H9812) was used. Dice similarity coefficients and the unweighted pair group method with averages were used to calculate similarity coefficients. *E. coli* strain O157:H7 - INCQS 00171 and strain *E. coli* O157:H7 isolated of outbreak from Argentina were used as positive controls.

2.6. Cytotoxicity assay

Expression of Stx1 and Stx2 toxins was tested by cytotoxicity assay in Vero cells, performed according to the “Manual of Vaccines and Diagnostics Tests and Vaccines for Terrestrial Animals”, from the World Organization for Animal Health (OIE, 2008). Two verotoxin-producing strains of *E. coli* O157:H7 and two non-toxin producing strains were included in each test as positive and negative controls, respectively. Cell viability evaluation was performed as described by Mosmann (1983) using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (USB Corporation, USA) assay. Vero cells were plated in 96 wells plates (2×10^4 cells per well) in minimum essential medium - MEM (Gibco, USA) containing 2 % fetal bovine serum (Gibco, USA) and 125 µL gentamicin (Marcolab, Brazil). The cells were incubated in 5 % CO₂ for 24 hours and after this period, 10 µL of bacterial supernatant was added to each well. Cells were incubated in 5 % CO₂ and morphological effects were observed after 24, 48 and 72 h under an inverted microscope.

Results were calculated with basis on the percentage of viable cells. Cells incubated with supernatant of non-verotoxigenic bacteria (100 % viable) were used as controls for comparisons. Results were analysed using Microsoft Excel 2010 software.

2.7. Antimicrobial analysis

E. coli O157:57 antimicrobial analyses were carried out according to National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI, 2012). Antibiotic disks (NewProv, Brazil) with ampicillin (AMP 10 µg), clindamicin (CLI 2 µg), cefoxitin (CFO 30 µg), cephalothin (CFL 30 µg), cefotaxime (CTX 30 µg), imipenem (IPM 10 µg), chloramphenicol (CLO 30 µg), gentamicin (GEN 10 µg), kanamycin (K 30 µg), streptomycin (EST 10 µg), amikacin (AMI 30 µg), ciprofloxacin (CIP 5 µg), nalidixic acid (NAL 30 µg), tetracycline (TET 30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT 25 µg) and sulfonamide (SUL 300 µg) were used. *E. coli* ATCC 8739 strain was used as a negative control.

3. Results

E. coli O157:H7 was isolated from 22 of 108 samples (20.37 %). Table 1 shows the characterization of sampling. The strains were isolated from carcasses of animals with different ages of both genders. Most of *E. coli* O157:H7 strains were isolated in summer months (18/22). Furthermore, the majority of isolates (17/22) were recovered from animals of Herval city, which is located in the southern Rio Grande do Sul. Most of the isolates (n=17) were recovered from P1, while only five isolates were recovered from P2 (n=4) and P3 (n=1) (Table 2).

Multiplex-PCR patterns are shown in Figure 1. The isolates could be classified in four distinct genotypic patterns (A, B, C and D) (Figure 1 and Table 2). Restriction enzyme analysis at PFGE with *Xba*I was able to discriminate six profiles (1 to 6; Table 2; Figure 2).

Antimicrobial assays demonstrated high levels of resistant strains, with 100 % of them resistant to CLI (Figure 3A). Resistance patterns were classified in seven resistance profiles, which were named in letters (a to g) (Figure 3B, Table 2). Cytotoxicity analysis revealed that 95.45 % (21/22) of the isolates

were verotoxic. Only one strain showed no cytotoxicity after 72 hours of exposure.

A general profile based on phenotypic and genotypic characteristics was created. According to results presented in Table 2, ten general profiles were identified (I to X). Isolates assigned to Profile I were recovered from different carcasses sampled in the same day at sampling point 1 (strains 9, 11, 12, 16, 17). The same Profile I also grouped strains isolated from the same carcass but at different sampling points (strains 20, 21 and 22). Interestingly, strains 7, 19 and C1 presented the same phenotypic and genotypic characteristics (profile VI), but two were isolated in the present study and other was isolated from a foodborne outbreak occurred in Argentina.

4. Discussion

E. coli O157:H7 strains have been isolated in more than 30 countries in the six continents (Bustamante et al., 2010; Esumeh et al., 2011; Oliveira et al. 2012; Velasco et al., 2012). In the United States, O157:H7 serotype was found in 63 % of feedlot cattle investigated in 13 states (Hancock et al., 1997). In Canada, Power et al. (2000) isolated *E. coli* O157:H7 from 1.6 % of 125 beef carcasses. Varela-Hernández et al. (2007), in México, analysed 258 beef carcasses, showing 2.7 % of samples contaminated with *E. coli* O157:H7. Although there are no reports of foodborne disease caused by *E. coli* O157:H7 in Brazil, in the present work, this bacterium was isolated from 6.21 % of the samples from a slaughterhouse.

In South America, Argentina presents the world's highest rate of HUS caused by *E. coli* O157:H7 in children less than four years, being considered endemic in that country (López et al., 1998; Rivas et al., 2006; Rivero et al., 2011). The most probable reason for the high rate of HUS in children is the early meat consumption (López et al., 1998). Uruguay and Chile are other countries where *E. coli* O157:H7 have been isolated (López et al., 1998). In contrast, in Brazil, there are no official reports of foodborne diseases caused by *E. coli* O157:H7, even though cases of HUS have been identified in the last decade in São Paulo state (Irina et al., 2002; Guth et al., 2002). This is the first study to isolate different *E. coli* O157: H7 strains in cattle meat and leather in southern Brazil.

Some previous reports have demonstrated the presence of Shiga toxin (Stx) producing *Escherichia coli* (STEC) in cattle faeces in Brazil, with prevalence ranging from 1.2 to 95 %, depending on the region (Cerqueira et al., 1999; Moreira et al., 2003; Hussein et al., 2005; Irino et al., 2005; Sales et al., 2006; Sandrini et al., 2007; Stella et al., 2008; Vicente et al., 2010). In southern Brazil, Moreira et al. (2003) have observed the occurrence of STEC in 95 % out of 60 farms investigated, and in 49 % of faecal samples from cows. Although high frequency of shiga toxin producing strains was observed, no *E. coli* O157:H7 isolation was obtained.

E. coli O157:H7 was previously isolated in other Brazilian states. In Rio de Janeiro, Cerqueira et al. (1999) isolated three *E. coli* O157:H7 strains in two stool samples and one beef meat sample from healthy cattle. Irino et al. (2005) have reported 1 % prevalence of *E. coli* O157:H7 among calf faeces collected in São Paulo. Another study in the same state has characterized the main virulence factors of 473 *E. coli* strains isolated from milk, water and faeces of dairy cattle (Stella et al., 2009).

In the present study, high frequency of *E. coli* O157:H7 was isolated from animals with 12-23 months of age (18/22). These results are in accordance with previously published data that shows higher prevalence of STEC in steers and calves (Cobbald et al. 2000; Nielsen et al. 2002; Moreira et al. 2003). Moreover, the largest number of strains was isolated in summer, and similar results were also reported by other studies (Chapman et al., 2001; Barckocy-Gallagher et al., 2003; Sandrini et al. 2007; Varela-Hernández et al., 2007). According to Centers for Disease Control, human cases of *E. coli* O157:H7 disease tends to peak during the warmer months (CDC, 2002).

E. coli O157:H7 pathogenesis is linked to different virulence factors such as Shiga toxins (*stx1* and *stx2* genes) and intimin (*eaeA* gene) (Nataro et al., 1998). In the present study, of 22 *E. coli* O157:H7 strains isolated from beef carcasses, 21 showed the presence of *stx1* and/or *stx2* genes. This finding is in accordance to other studies (Bangkok et al., 1996; Elder et al., 2000; Parma et al., 2000; Barckocy-Gallagher et al., 2003; McEvoy et al., 2003). STEC isolated from healthy cattle usually have the same combination of virulence genes found in isolates from humans (Wieler et al., 1996, Kobayashi et al. 2001). The set of virulence factors necessary to cause STEC-related disease is not well defined;

however, there are associations between the presence of specific genes and the ability of STEC to cause health problems in humans. *E. coli* O157:H7 toxins profile from clinical isolates showed that patients infected with strains carrying the *stx2* gene were 6.8 times more likely to develop severe disease than those infected with strains carrying *stx1* or *stx1/stx2* (Ostroff et al., 1989b). Another study found that Stx2 had lethal dose 50 % lower than Stx1 when administered to mice (Boerlin et al., 1999). On other hand, STEC toxigenic strains isolated from patients with HUS or acute diarrhoea showed that the predominant genotype was *stx1/stx2* or only *stx1* (Prado et al., 1995; Rios et al., 1999). Importantly, in the last seven years, an association between strains carrying *stx2a* and *eaeA* genes and HUS has been observed (Scheutz et al., 2012). In the present study, eight *E. coli* O157:H7 strains had *stx2* and *eaeA* genes, suggesting that these strains are virulent. Another method to identify bacterial strains able to produce shigatoxin is cellular viability assays in Vero cells. In the present study, it was observed that 95.2 % of the isolates with *stx1* and *stx2* genes were cytotoxic.

The treatment of *E. coli* O157:H7 infections with antibiotics is not recommended, since pathogenic strains usually produce higher amounts of toxin after being exposed to antibiotics; nevertheless studies to evaluate the antimicrobial resistance of *E. coli* O157:H7 have been performed (Karmali et al., 2010) and are important to strain characterization. The antimicrobial sensitivity results obtained in the present study showed high levels of resistance. All strains were resistant to clindamycin and six were multi-resistant. Moreover, a few strains were resistant to streptomycin, trimethoprim and sulphonamide/tetracycline, which are among the most important resistance patterns in *E. coli* O157:H7 (White et al., 2002; Mora et al., 2005; Karmali et al., 2010). Some studies show higher rates of antimicrobial resistance in *E. coli* O157 strains isolated from cattle in comparison to those isolated from humans (Meng et al., 1998; Schroeder et al., 2002; Mora et al., 2005). In the present study, the strain C1, isolated from a human case of HUS in Argentina, was resistant to four antimicrobials, while five animal strains were resistant to more drugs.

The major diversity of *E. coli* O157:H7 strains (five general profiles) was found in P1 where animals were sampled on hide surfaces. These results were

expected, since the animals came from producers from different regions. Profile I grouped the largest number of strains, coming from different carcasses, as well as from different process points sampled on the same day. Strains with the same profile sampled on the same day but in different animals may indicate cross-contamination in the breeder, transport and/or at the beginning of slaughter. However, the same strain isolated at different process points may indicate cross-contamination inside the slaughterhouse and should be prevented by good manufacturing practice procedures. A very interesting result reported in our study is the phenotypic and genotypic similarity of strains 7, 19 and C1. This result may suggest the transfer of *E. coli* O157:H7 clones between Brazil and Argentina. However it is not possible to predict the origin of that strain, as it could be in Brazil without being diagnosed before the year in which it was identified in Argentina.

5. Conclusions

E. coli O157:H7 isolation in carcasses indicates cattle contamination in southern Brazil. Although the incidence of STEC human infection in Brazil is low, the severity of renal and neurological symptoms caused by *E. coli* O157:H7 are of public health importance and the knowledge about the foods that may be possible contamination sources is of great importance. Most strains possess toxin genes, which cause human infections. One of them has the same genotypic profile of a strain involved in foodborne outbreaks in Argentina. Therefore, this situation may represent an increased risk for meat consumers and a challenge for those working in the beef sanitary control service. Early detection of *E. coli* O157:H7 can be considered a positive conduct to avoid foodborne outbreaks, giving opportunity for applying preventive measures in meat chain production of southern Brazil.

Acknowledgments

This research was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), and Secretaria do Desenvolvimento Agrário (SDA) with grant No. 64/2008, coordinated by Dr. Bernadette D.G.M. Franco. We would like to thank the slaughterhouse, for providing the venue for samples

collection, and to Dr. Dalia Rodriguez, from Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), for helping with serotyping and PFGE analysis. M. R. Loiko was in receipt of DTI I grant from FINEP/CNPq/SANIMARS, grant number 01.10.0783.00. P.M. Roehe is CNPq1A research fellow.

References

- Andrews, W., Hammack, T.S., 1998. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. In: Food and Drug Administration (Ed.), Bacteriological Analytical Manual, Rockville, MD. pp. 26-36.
- Ateba, C.N., Mbewe, M. 2011. Detection of *E. coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. *Research in Microbiology* 162, 240-248.
- Barckocy-Gallagher, G.A., Terrance, M.A., Rivera-Betancourt, M., Nou, X., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koochmaraie, M., 2003. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* including O157:H7 and non-O157 serotypes, and Salmonella in commercial beef processing plants. *Journal of Food Protection*. 66, 1978-1986.
- Barlow, R.S., Gobius, K.S.; Desmarchelier, P.M., 2006. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: results of a one-year study. *International Journal of Food Microbiology* 111, 1-5.
- Bell, B.P., M. Goldoft, P.M. Griffin, M.A. Davis, D.C. Gordon, P.I. Tarr, C.A. Bartleson, J.H. Lewis, T.J. Barrett ,J.G.; Wells., 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington Experience. *JAMA* 272, 1349-1353.
- Bergamini, A.M.M., Simões, M., Irino, K., Gomes, T.A.T; Guth, B.E.C., 2007. Prevalence and characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 38, 553-556.
- Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., Gyles, C.L., 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 497-503.

- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathogens And Disease* 3, 59-67.
- Bustamante, A.V., Sanso, M.A., Lucchesi, P.M.A., Parma, A.E., 2010. Genetic diversity of O157:H7 and non-O157 verotoxigenic *Escherichia coli* from Argentina inferred from multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). *International Journal of Medical Microbiology* 300, 212-217.
- Centers for Disease Control - CDC, 2002. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating ground beef—United States, June–July. *MMWR-Morbidity and Mortality Weekly Report* Vol.51, n° 29, 637-639.
- Cerqueira, A.M.F., Guth, B.E.C., Joaquin, R.M., Andrade, J.R., 1999. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Microbiology* 70, 111-121.
- Chapman, P.A., Cerdan Malo, A.T., Ellin, M., Ashton, R., Harkin, M.A., 2001. *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* 64, 139-150.
- Commission Regulation (EC) N° 1441/2007. Amending Regulation (EC) N° 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, pp.18.
- Cobbold, R., Desmarchelier, P., 2000. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Veterinary Microbiology* 71, 125-137.
- Elder, R.O.; Keen, J.E.; Siragusa, G.R.; Barkocy-Gallagher, G.A.; Koohmaraie, M.; Laegreid, W.W. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)* 97, 2999–3003.
- Esumeh, F.I.; Isibor, J.O.; Egbagbe, I.D.S. 2011. Screening for *Escherichia coli* O157:H7 in diarrheic patients in Benin City, Nigeria. *Journal of Microbiology & Biotechnology* 1, 1-4.

- Etcheverría, A.I.; Padola, N.L.; Sanz, M.E.; Polifroni, R.; Krüger, A.; Passucci, J.; Rodríguez, E.M.; Taraborelli, A.L. 2010. Ballerio, M.; Parma, A.E. Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. *Meat Science* 86, 418-421.
- Etcheverría, A. I & Padola, N. L. 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* Factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence* Vol. 4, Issue 5, 366–372.
- Ethelberg, S.; Olsen, K.E.; Scheutz, F.; Jensen, C.; Schiellerup, P., Enberg, J., 2004. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark, *Emerging Infectious Diseases* 10, 842–7.
- Feng, P. & Monday, S.R., 2000. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Molecular and Cellular Probes* 14, 333-337.
- Fu, C. J.; Porter, J. H.; Felton, E. E. D.; Lehmkuhler; J. W.; Kerley, M. S. 2003. Pre-harvest factors influencing the acid resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. *Journal Animal Science* 81, 1080-1087.
- Guth, B.E.C.; Ramos, S.R.T.S.; Cerqueira, A.M.F.; Andrade, J.R.C.; Gomes, T.A.T. 2002. Phenotypic and genotypic characteristics and epidemiologic findings of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. *Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 1085-1089.
- Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 122-140.
- Hancock, D.D.; Besser, T.E.; Rice, D.H.; Herriott, D.E.; Tarr, P.I. 1997. The longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiology and Infection* 118, 193-195.
- Hussein, H.S., 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of Animal Science* 85, 63-72.
- International Organization for Standardization (ISO) 16654–2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. British Standard, Incorporating Corrigendum No. 1.
- Irino, K.; Vaz, T.M.I.; Kato, M.A.M.F.; Naves, Z.V.F.; Lara, R.R.; Marco, M.E.C.; Rocha, M.M.M.; Moreira, T.P.; Gomes; T.A.T.; Guth, B.E.C. 2002. O157:H7

- shiga toxin-producing *E. coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. *Emerging Infectious Disease* 8, 446-447.
- 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. 2005. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. *Veterinary Microbiology* 105, 29-36.
- Karmali, M.A., 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2, 15-38.
- Karmali, M.A.; Gannon, V.; Sargeant, J.M. 2010. Review: Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology* 140, 360-370.
- Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S., Yamamoto, K., 2001. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 484-489.
- Lanier, W.A., Hall, J.M.; Herlihy, R.K.; Rolfs, R.T., Wagner, J.M.; Smith, L.H.; Hyytia-Trees, E.K. 2011. Outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with rodeo attendance, Utah and Idaho, 2009. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 1131-1133.
- López, E.L., Contrini, M.M., De Rosa, M.F. 1998. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. In: Kaper, J.B., O'Brien, A.D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 30-37.
- Mercado, E.C. 2007. Síndrome Urémico Hemolítico: ¿por qué Argentina? *Revista Argentina de Microbiología* 39, 191-192.
- Moreira, C.N., Pereira, M.A., Brod, C. S., Rodrigues, D.P., Carvalhal, J.B., Aleixo, J.A.G., 2003. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Veterinary Microbiology* 93, 179-183.
- Meng, J., Zhao, S., Doyle, M.P., Joseph, S.W., 1998. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 from animals, food and humans. *Journal of Food Protection* 61, 1511-1514.
- Mora, A., Blanco, J.E., Blanco, M., M. Alonso, M.P., Dhahi, G., Echeita, A., González, E.A., Bernárdez, M.I., Blanco, J., 2005. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157

- strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology* 156, 793-806.
- McEvoy, J.M., Doherty, A.M., Sheridan, J.J., Thomson-Carter, F.M., Garvey, P.; McGuire, L., Blair, I.S., McDowell, D.A., 2003. The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *Journal of Applied Microbiology* 95, 56-266.
- Money, P.; Kelly, A.F.; Gould, S.W.J.; Denholm-Prince, J.; Threfall, E.J.; Flelder, M.D. 2010. Cattle, Weather and Water: mapping *Escherichia coli* O157:H7 infections in humans in England in Scotland. *Environmental Microbiology*, 2633-2644.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
- Nataro, J.P.; Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 142-201.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards International/CLSI. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI/NCCLS 2012-document M100 – S21, vol.31, Issue 1, January 2012 .CLSI, Wayne, PA, USA.
- Nielsen, E. Conny Tegtmeier, Hans Jorgen Andersen, Carsten Gronbaek, Jens S. Andersen. 2002. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Veterinary Microbiology* 88, 245-257.
- Nishimura, L.S.; Souza, R.L.; Guth, B.E.C. Identificação de um caso de síndrome hemolítica urêmica relacionado à infecção por *E. coli* produtora da toxina Shiga O157 no estado de São Paulo, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, XXIII, 2005, Santos, SP. Anais. Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005.
- Oliveira, M.; Viñas , I.; Usall, J.; Anguera, M.; Abadías, M. 2012. Presence and survival of *E. coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology* 156, 133-140.
- Ostroff, S.M., Tarr, P.I., Neill, M.A., Lewis, J.H., Hargrett-Bean, N. and Kobayashi, J.M. 1989. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants

- of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. The Journal of Infectious Diseases 160, 994-999.
- Paiba, G.A.; Wilesmith, J.W.; Evans, S.J.; Pascoe, S.J.S.; Smith, R.P.; Kidd, S.A.; Ryan, J.B.M., McLaren, I.M., Chappell, S.A., Willshaw, G.A., Cheasty, T., French, N.P., Jones, T.W.H., Buchanan, H.F., Challoner, D.J., Colloff, A.D., Cranwell, M.P., Daniel, R.G., Davies, I.H., Duff, J.P., Hogg, R.A.T., Kirby, F.D., Millar, M.F., Monies, R.J., Nicholls, M.J., Payne, J.H., 2003. Prevalence of faecal excretion of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in cattle in England and Wales. Veterinary Record, 153, 347-353.
- Parma, A.E., Sanz, M.E., Blanco, J.E., Blanco, J., Vinas, M.R., Blanco, M., Padola, N.L., Etcheverrõa, A.I., 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina - Importance in public health. European Journal of Epidemiology 16, 757-762.
- Paton, A.W., Paton, J.J. 2005. Multiple PCR for direct detection of shiga Toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. Journal of Clinical Microbiology 43, 2944-2947.
- Paton, J.C., Paton, A.W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. Clinical Microbiology Reviews 11, 450–479.
- Paula, C.M.D., Geimba, M.P., Amaral, P.H., Tondo, E.C. 2010. Antimicrobial resistance and PCR-Ribotyping of Shigella responsible for foodborne outbreaks occurred in southern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 41, 20-30.
- Pigatto, C.P., 2004. Isolamento e frequência de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) em cultura fecal de bovinos no estado do Paraná, Curitiba, pp.1-84.
- Rivas, M., Balbi, L., Miliwebski E., Garcia, B., Tous, M., Leardini, N., Prieto, M.A., Chillemi, G.M., de Principi, M.E., 1998. Síndrome Urémico Hemolítico em niños de Mendonza, Argentina: su asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Medicina 58, 1-7.
- Rivas, M., Caletti, M.G., Chinen, I., Refi, S.M., Roldán, C.D., Fiorilli, G.C.G., Bertolotti, A., Aguerre, L., Estani, S.S., 2003. Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. Emerging infectious diseases 9, 1184-6.

- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., Leotta, G.A., 2006. The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission. *Medicina*. 66, 27-32.
- Rivas, M., Sosa, E.S., Rangel, J., Caletti, M.G., Vallés, P., Roldán, C. D., Balbi, L., Marsano, D.M.M.C., Amoedo, D., Miliwebsky, E., Chinen, I., Hoekstra, R.M., Mead, P., Griffi, N.P.M., 2008. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. *Emerging Infectious Diseases* 14, 763.
- Rivero, M.A., Passucci, J.A., Rodriguez, E.M., Signorini, M.L., Tarabla, H.D., Parma, A.E., 2011. Factors Associated with Sporadic Verotoxigenic *Escherichia coli* Infection in Children with diarrhea from the Central Eastern Area of Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 901-906.
- Rios, M., Prado, V., Trucksis, M., Arellano, C., Borie, C., Alexandre, M., Fica, A., Levine, M.M., 1999. Clonal diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 778-781.
- Sandrini, C.N.M., Pereira, M.A., Brod, C.S., Carvalhal, J.B., Aleixo, J.A.G., 2007. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural* 37, 175-182.
- Sales, S.S., Costa, F.N., Alves, L.M.C., Barrozo, L.M., Viana, A.M.H., Leal-Mesquita E.R., Monteiro-Neto V., 2006. Ocorrência de *E. coli* produtora de toxinas “Shiga” (STEC) na microbiota intestinal de bovinos destinados ao abate no município de São Luís–MA, Brasil. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 101, 245-251.
- Sanz, M.E., Vinãs, M.R., Parma, A.E., 1998. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *European Journal of Epidemiology*, Vol. 14, Issue 4, 399-403.
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., O’Brien, A.D., 2012. Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and

- Standardizing Stx Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 2951-2963.
- Schroeder, C.M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D.D., McDermott, P.F., Walker, R.D., Meng, J., 2002. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 576-581.
- Silva, N., Silveira, N.F.A., Contreras, C., Beraquet, N.J., 2001. Ocorrência de *Escherichia coli* O157: H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. *Ciência Tecnologia Alimentos* 21, 223-227.
- Souza, R.L., Carvalhaes, J.T.A., Nishimura, L.S., Andrade, M.C., Guth, B.E.C., 2011. Hemolytic Uremic Syndrome in Pediatric Intensive Care Units in São Paulo, Brazil. *The Open Microbiology Journal* 5, 76-82.
- Stella, A.E., Rigobelo, E.C., Oliveira, A.C., Maluta, R.P., Marin, J.M., Ávila, F.A., 2009. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *E. coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto- SP, Brasil. *Veterinária e Zootecnia* 15, 66-74.
- Varela-Hernández; J. J., Cabrera-Díaz, E., Cardona-López, M.A., Ibarra-Velázquez, L.M., Rangel-Villalobos, H., Castillo, A., Torres-Vitela, M.R., Ramírez-Álvarez, A., 2007. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. *International Journal of Food Microbiology* 113, 237-241.
- Vaz, T.M.I., Irino, K., Kato, M.A.M.F., Dias, A.M.G., Gomes, T.A.T., Medeiros, M.I.C., Rocha, M.M.M., GUTH, B.E.C., 2004. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *E. coli* in São Paulo, Brazil, from 1976. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 903-905.
- Velasco, G.L., Tydings, H.A., Boyer, R.R., Falkinham, J.O., Ponder, M.A., 2012. Characterization of interactions between *E. coli* O157:H7 with epiphytic bacteria in vitro and on spinach leaf surfaces. *International Journal of Food Microbiology* 153, 351-357.
- Vicente, H.I.G., Amaral, L.A., Nunes, A.P., Lorenzon, C.C., 2010. *Escherichia coli*, produtoras de Shigatoxinas detectadas em fezes de bovinos leiteiros. *Arquivos do Instituto Biológico* 77, São Paulo, 567-573.

- White, D.G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D.D., Mcdermott, P.F., 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes and Infection* 4, 405-412.
- Wieler, L.H., Vieler, E., Erpenstein, C., Schlapp, T., Steinrück, H., Bauerfeind, R., Byomi, A., Baljer, G., 1996. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 69 strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2980-2984.
- World Organization for Animal Health (OIE), 2008. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th Ed., Vol. 2.

Tables

Table 1. Sampling characterization. Information about season in which samples were collected, city of origin and age of cattle are shown.

Sampling	Season	City of origin	Age of Cattle (months)	Number of collected samples	Number of isolates
01	spring	Rosário do Sul	> 24	10	ND
02	autumn	Alegrete	12 - 23	10	ND
03	winter	Rio Pardo/Arroio Grande	12 - 23	25	ND
04	spring	Pinhal Grande	> 24	31	4
05	summer	Jarí	12 - 23	15	1
06	summer	Herval	12 - 23	17	17

ND: Not detected

Table 2. *E. coli* O157:H7 profiles with genotypic and phenotypic characteristics.

Strain identification	Sampling	Animal identification	Collection point	PCR pattern***	PFGE pattern	Cytotoxicity	Resistance pattern	MDS	General profile
1	4	2	NA	D	3	-	b	+	V
2	4	3	NA	B	2	+	a	+	IV
3	4	14	NA	B	2	+	a	+	IV
4	4	15	NA	B	2	+	a	+	IV
5	5	10	2	B	4	+	f	+	VIII
6	6	3	1	A	5	+	d	+	VII
7	6	4	1	A	5	+	c	+	VI
8	6	6	1	B	1	+	a	+	II
9	6	7	1	C	1	+	a	+	I
10	6	8	1	C	1	+	e	+	IX
11	6	9	1	C	1	+	a	+	I
12	6	10	1	C	1	+	a	+	I
13	6	11	1	B	1	+	a	+	II
14	6	14	1	B	1	+	a	+	II
15	6	15	1	A	1	+	a	+	III
16	6	16	1	C	1	+	a	+	I
17	6	17	1	C	1	+	a	+	I
18	6	1	2	B	1	+	a	+	II
19	6	5	2	A	5	+	c	+	VI
20	6	13	1	C	1	+	a	+	I
21	6	13	2	C	1	+	a	+	I
22	6	13	3	C	1	+	a	+	I
*C1	-	NA	NA	A	5	+	c	+	VI
**C2	-	NA	NA	A	6	+	g	+	X

*Positive control from Argentina.

**Positive control from Brazil (INCQS 00171).

***PCR pattern A: *eae*, *stx1*, *stx2*, *rfbO157*; PCR pattern B: *eae*, *stx2*, *rfbO157*; PCR pattern C: *stx2*, *rfbO157*; PCR pattern D: *rfbO157*.

NA: Not applicable. Strains 1 to 4 were analysed in pool from the three collection points.

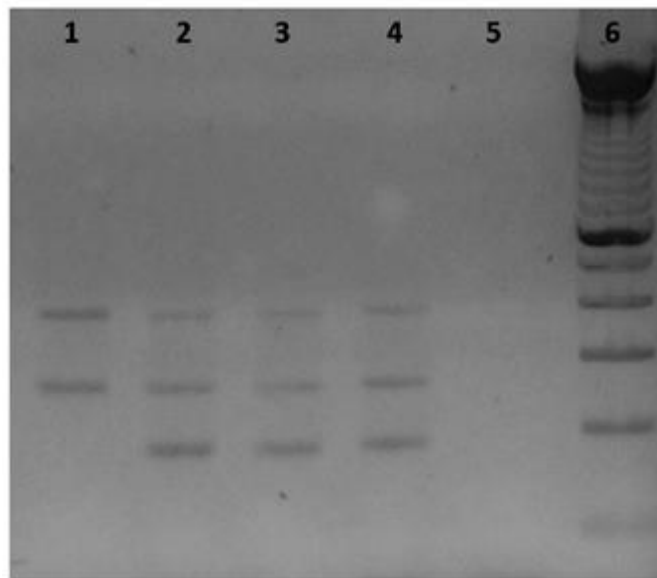


Figure 1. Multiplex-PCR to *E. coli* O157:H7 virulence genes. Lanes 1 to 3: 13, 15 and 19 isolates; lane 4: control strain C2 (*E. coli* O157: H7-INCQS 171); lane 5: negative control strain (ATCC 8739); lane 6: 100 bp molecular weight marker. *eae* gene (384 bp), *stx2* gene (255 bp) and *stx1* gene (180 bp).

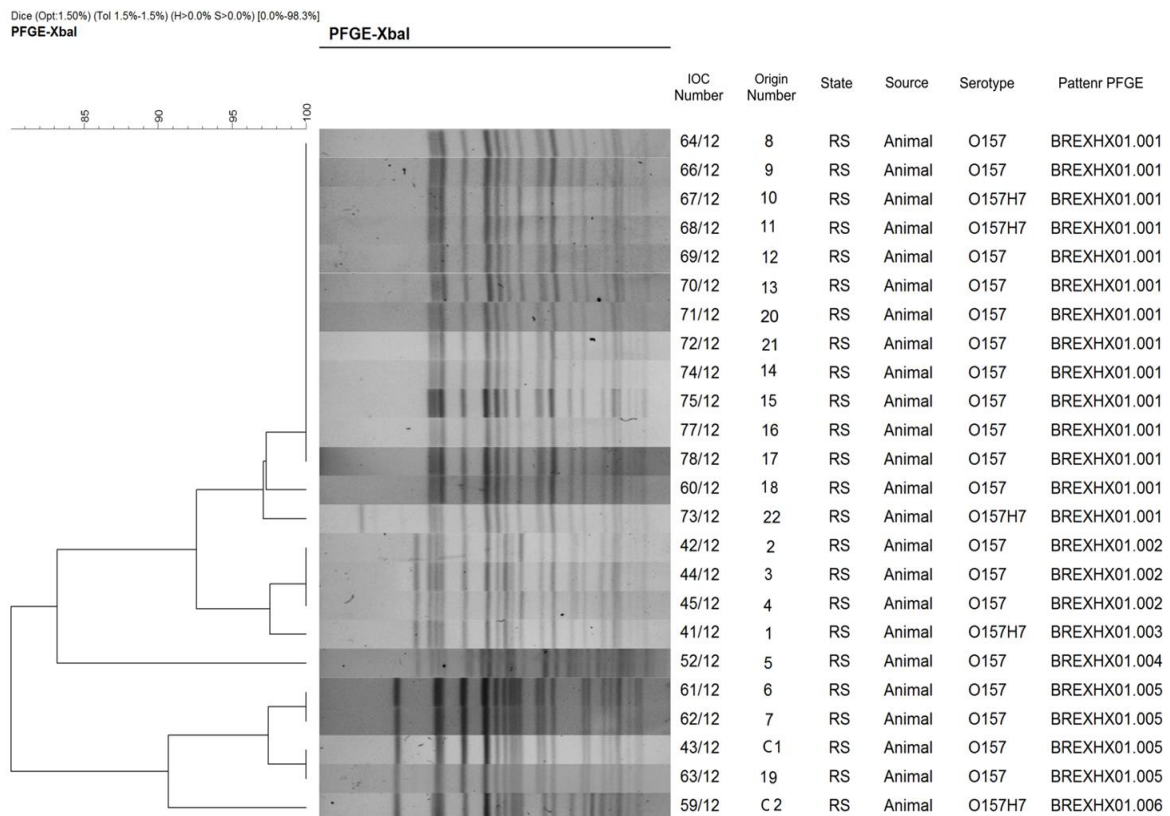


Figure 2. Dendrogram showing the phylogenetic relationship between *E. coli* O157 isolates based on PFGE analysis. *Pattern 5: C1 strain – Positive Control isolated from an Argentine outbreak; **Pattern 6: C2 strain - Positive Control – INCQS 00171. IOC – Instituto Oswaldo Cruz.

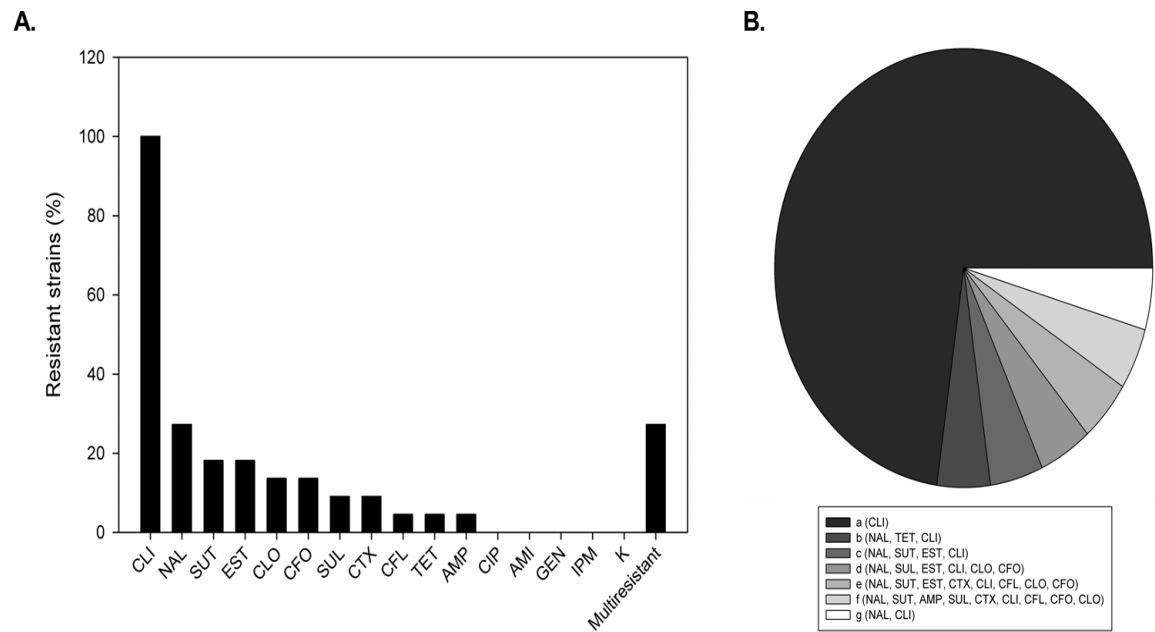


Figure 3. Resistance patterns of *E. coli* O157 isolates. A. Percentage of resistant strains to each tested antibiotic. B. Profiles and frequency distribution of resistance patterns.

CAPÍTULO 3

3.1 DISCUSSÃO GERAL

No Brasil a bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio, gerando mais de R\$ 50 bilhões com exportações de carne, além de gerar milhões de empregos no país. Além disso, o Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina do mundo e líder mundial de exportação desse produto (ABIEC, 2011).

A qualidade microbiológica dos alimentos consumidos pela população é um aspecto de grande importância por se tratar de uma questão de saúde pública. Além disso, a qualidade e a segurança dos produtos cárneos são importantes exigências do mercado nacional e internacional.

A quantificação da população de micro-organismos viáveis das superfícies das carcaças é comumente utilizada para fornecer dados que indiquem o grau de cuidados higiênico - sanitários durante as operações de abate, particularmente na esfolagem e evisceração (ZWEIFEL et al., 2003). Esses micro-organismos indicadores têm sido muito utilizados devido a sua correlação com a presença de patógenos (LANDGRAF, 2008).

Um dos principais critérios utilizados para avaliar a segurança dos alimentos é a investigação de micro-organismos patogênicos. Entre os patógenos de importância na carne bovina, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* são micro-organismos de interesse nacional e internacional nos últimos anos (SOFOS et al., 2010). Além deles, os micro-organismos indicadores de higiene, como os aeróbios mesófilos e coliformes são bastante úteis para a avaliação dos processos industriais de abate de bovinos e processamento de carne.

Devido as suas características intrínsecas, a carne é um excelente substrato para a multiplicação de inúmeros micro-organismos, sendo muitos os fatores que podem favorecer o desenvolvimento microbiano (SOFOS et al., 2008). A carne está exposta às contaminações de natureza microbiana em todas as fases do seu processamento tecnológico, particularmente nas operações em que é mais manipulada e sempre que não são tomados os cuidados especiais em relação às Boas Práticas de Fabricação (SOFOS et al., 2008; ETCHEVERRIA et al., 2010).

No presente estudo, foram avaliadas 108 carcaças bovinas em um matadouro frigorífico com inspeção federal, localizado na região central do estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. Essa pesquisa faz parte de um projeto que está propondo a implantação de um Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para

Avaliação de Riscos Microbiológicos em Produtos de Origem Animal (CDA – ARMPOA). Tal projeto visa dar subsídios para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e para o setor produtivo na tomada de decisões em relação aos riscos envolvidos no consumo e comercialização da carne bovina brasileira.

A escolha do matadouro frigorífico para as análises das carcaças foi devido à sua localização ser em uma região central do interior do estado e receber animais para os abates oriundos de todas as regiões do Rio Grande do Sul, inclusive animais de cidades que fazem fronteira com Argentina e Uruguai, onde casos de SHU são frequentes e *E. coli* O157 é o sorotipo prevalente (RIVAS et al., 2003; GADEA et al., 2004; MERCADO, 2007).

No total dos pontos avaliados, neste estudo, as contagens em cada ponto analisado demonstraram valores bastante variáveis, onde a média para a contagem de mesófilos totais foi de 4,98, 2,90 e 2,30 log UFC/cm² para o P1, P2 e P3, respectivamente. Nas contagens de *E. coli* as médias obtidas foram de 2,33, 0,63 e 0,09 log UCF/cm² para o P1, P2 e P3, respectivamente. Houve reduções significativas quando as contagens de P1 foram comparadas com as do P2 e P3, tanto em relação à contagem de mesófilos totais como para *E. coli*. O mesmo não foi observado quando comparadas as médias das contagens do P2 e P3 em relação a mesófilos totais e *E. coli*. As altas contagens no P1, tanto de mesófilos como de *E. coli*, podem ser explicadas pelo fato de que o local da amostragem foi o couro do animal, que possui uma maior contaminação devido às sujidades, fezes, terra, poeira, entre outras. As contagens mais baixas no P2 e P3 podem ser justificadas devido à remoção do couro de forma apropriada e devido o local da amostragem ser o tecido muscular das carcaças. Constatou-se a ausência de diferença estatisticamente significativa entre o P2 e P3 para mesófilos totais e *E. coli*, em diversas coletas.

O que se observa nos valores das contagens, tanto para mesófilos totais quanto para *E. coli*, foi uma redução das contagens entre os três pontos avaliados nas coletas de número três, cinco e seis, onde as contagens iniciais estavam altas e se observou uma diminuição significativa entre os P1, P2 e P3. Essa redução pode ter se dado devido à correta remoção do couro e a correta manipulação da carcaça nos P2 e P3.

As médias das contagens de mesófilos, nas amostras das carcaças bovinas, encontradas neste estudo no P1, mostraram-se superiores aos valores encontrados por Zweifel et al. (2005), na Suíça, onde avaliaram 800 carcaças e cujas médias variaram entre 2,1 a 3,1 log UFC/cm². Em outro estudo Zweifel et al. (2008), também na Suíça, analisaram 535 carcaças bovinas em frigoríficos de baixa capacidade e encontraram contagens de microrganismos viáveis variando entre 2,7 e 3,8 log UFC/cm². Na Espanha, Martínez et al. (2009) obtiveram, na maioria das carcaças amostradas por swab, níveis de mesófilos entre 3,10 e 4 log UFC/cm². Em estudo realizado por França et al. (2006), no Brasil, as contagens ficaram entre 4,7 e 4,5 log UFC/cm², valores esses semelhantes aos encontrados neste estudo.

Os valores elevados para mesófilos totais em algumas coletas, do presente estudo, podem ser justificados devido a fatores ambientais, uma vez que as coletas 1, 5 e 6 foram realizadas no verão e a temperatura elevada pode ter influenciado na multiplicação de micro-organismos. A coleta 3 foi realizada em um período chuvoso do inverno, isso pode ter sido um dos fatores que contribuiu para as altas contagens, devido os animais apresentarem maior sujidades no pelo e com isso uma maior contaminação. Bovinos oriundos de criação extensiva (pasto), tipo de criação predominante no Rio Grande do Sul, também pode ser um fator que contribuiu para as altas contagens microbianas. De acordo com Jardim et al. (2006) animais alimentados em pastagens podem tornar-se mais susceptíveis à contaminação, principalmente em relação ao couro, sendo eventuais fontes de contaminação forrageiras, águas, fezes, solo e esgotos, além do próprio manejo dos bovinos em relação ao tipo de criação, a pasto ou em confinamento.

De acordo com Gil (2002), apenas quando o número de micro-organismos viáveis na superfície de carcaças de bovinos ultrapassa a 10⁵/cm² pode-se afirmar que o abate ocorreu em más condições de higiene, diferente dos níveis considerados aceitáveis pela decisão 471/2001 da União Europeia (EC, 2001), que considera aceitáveis níveis até 3,5 Log UFC/cm². Foram observadas contagens altas para mesófilos totais somente no P1, no couro do animal, em todas as coletas. Após a retirada do couro as contagens reduziram consideravelmente, mostrando um controle higiênico nas etapas subsequentes do abate. Somente na última coleta (06), realizada no mês de fevereiro de 2012, as contagens de mesófilos ficaram acima dos níveis considerados aceitáveis e, conseqüentemente, o P2 e P3

apresentaram contagens elevadas em relação aos valores encontrados nas coletas anteriores.

Em relação aos coliformes totais e *E. coli* a *Food Standards Agency* (FSA) (2002) do Reino Unido, considera satisfatória a média logarítmica menor ou igual a 1,5 log UFC/cm²; aceitável entre 1,5 e 2,5 log UFC/cm² e não satisfatória se ultrapassar 2,5 log UFC/cm². Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), desde 1997, o desempenho satisfatório para a contagem de *E. coli* é menor ou igual a 100 UFC/cm², o que seria equivalente a 2 log UFC/cm².

Em relação ao P1, neste estudo, onde o animal ainda apresentava o couro, as contagens de quatro coletas (1, 3, 5 e 6) ficaram em torno de 2,38 a 3,32 log UFC/cm², valores inferiores ao encontrado por Bacon et al. (2000), nos EUA, que obtiveram contagens de *E. coli* de 5,5 a 7,5 log UFC/cm² analisando carcaças bovinas.

As contagens de *E. coli* demonstraram, em relação aos P2 e P3, valores abaixo do limite exigido pelo MAPA, valores de 0,10 a 2,0 log UFC/cm², sendo considerados satisfatórios, nos pontos onde a carcaça estava sem o couro (P2) e meia-carcaça (P3). Dados que corroboram com os encontrados por Jardim et al. (2006) que encontraram 0,42 log UFC/cm² de *E. coli* em carcaças bovinas, após a lavagem. Estudo semelhante conduzido por Gill et al. (2000), no Canadá, avaliando as condições bacteriológicas de 50 carcaças bovinas, após a etapa de lavagem, demonstrou contagens médias de 1,50 log UFC/100cm² para *E. coli*. As contagens de *E. coli* obtidas por Alonso et al. (2007), antes da esola do animal, ficaram em torno de 2,2 log UFC/cm², em bovinos de confinamento, e após lavagem das meias-carcaças, porém, a contaminação não pôde mais ser evidenciada, demonstrando a importância da lavagem final das carcaças antes dos resfriamento, resultados semelhantes aqueles encontrados nesta pesquisa.

Conforme Loessner et al. (2005) concentrações elevadas de micro-organismos indicadores de higiene podem ser um indicador da presença de bactérias potencialmente patogênicas, tais como *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 e ressaltam ainda a importância da eliminação e/ou minimização da ocorrência de contaminação cruzada.

Em relação a este estudo, o que se observou foi que os isolamentos das cepas de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157 ocorreram nas coletas em que as

contagens de mesófilos totais estavam em maior número. Em relação aos isolamentos de *Listeria*, os resultados encontrados corroboram o estudo realizado por Barros (2007) onde foi avaliada a relação entre a presença de *L. monocytogenes* e os níveis da microbiota acompanhante em carnes e plantas de processamento. Nesse estudo foi verificado que não houve interferência dos micro-organismos indicadores pesquisados sobre a detecção de *L. monocytogenes*. Em relação à cepa de S. Livingstone o que pôde ser observado foi que o isolamento ocorreu na coleta onde os valores de mesófilos totais se encontravam baixos em relação às demais coletas, fato esse que pode ter contribuído para o isolamento de *Salmonella*.

Nesse estudo, as cepas isoladas foram 11 cepas de *Listeria* spp. (10,19%), 1 cepa de *Salmonella* Livingstone (0,93%), e 22 cepas de *E. coli* O157:H7 (20,37%) nas 108 amostras analisadas de carcaça bovina. Dentre as amostras positivas para *Listeria* spp. 6,48% (7/108) foram *L. monocytogenes*, sendo quatro isolados identificados como sorovar 1/2a e três isolados do sorovar 4b. Também foram identificadas duas *L. innocua* sorovar 6a e duas cepas de *Listeria* sp.

Patógenos alimentares foram isolados de animais oriundos de seis dentre as sete cidades investigadas neste estudo. O maior número de isolados de *E. coli* O157:H7 foram provenientes de animais do município de Herval, o qual fica localizado ao sul do Estado do Rio Grande do Sul, fazendo fronteira com o Uruguai.

As carcaças analisadas foram provenientes de animais com diferentes idades (16 a 48 meses) e sexos, porém as cepas de *E. coli* O157:H7 foram isoladas somente em fêmeas e novilhos, resultados que corroboram com o estudo feito por Paiba et al. (2003), na Inglaterra, analisando amostras de fezes de bovinos, onde a prevalência dos isolamentos de *E. coli* O157 foi maior nos animais jovens. No Brasil, um estudo realizado por Sandrini et al. (2007), em 243 bovinos de leite, a partir de *swab* retais, também demonstrou cepas de STEC pertencentes a sorogrupos patogênicos em uma porcentagem baixa (2,4 %, 8/328 isolados), onde 71,4% (5/7) dos animais positivos tinham idade inferior a 12 meses.

Em relação aos pontos avaliados, o ponto em que ocorreu o maior número de isolamentos de cepas patogênicas, dentro do matadouro frigorífico, foi o P1, onde foram isoladas três cepas de *L. monocytogenes*, duas de *L. innocua*, duas de *Listeria* sp. e 16 cepas de *E. coli* O15:H7. No ponto 2 (P2), após a esfolagem, foram isolados três cepas de *L. monocytogenes* e três cepas de *E. coli* O157:H7. No P3,

onde já havia meias carcaças, foi isolada uma cepa de *L. monocytogenes*, uma cepa de *S. Livingstone* e duas cepas de *E. coli* O157:H7. Os isolamentos de cepas potencialmente patogênicas no P1 podem ser explicados pelo fato de que o local da amostragem foi o couro do animal, que apresentou uma maior contaminação em relação às contagens totais, devido às sujidades e o pêlo do animal. Em relação à manutenção de alguns patógenos no P2 e P3, após a retirada do couro, pode-se justificar em função de contaminação cruzada no ambiente de processo, como facas, ganchos, superfícies, de acordo com Guerra et al. (1999) pode ser um indicativo da falta de condições sanitárias satisfatórias durante o processamento do alimento.

As cepas de *Listeria* spp. foram isoladas tanto nas coletas realizadas nos meses de primavera (coleta 01), no inverno (coleta 03) quanto no verão (coleta 06), enquanto a maioria das *E. coli* O157:H7 foram isoladas apenas nos meses de verão (coletas 05 e 06). Em relação à cepa de *S. Livingstone* o isolamento ocorreu no mês de inverno (coleta 4). Com relação à sazonalidade, a primavera e o verão foram as estações do ano que apresentaram maior número de amostras positivas para *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. com oito cepas isoladas (72,7%) e somente três cepas foram isoladas no mês de inverno (27,3%), resultado semelhante ao encontrado por Yoshida et al. (1998) e Uhtil et al. (2004) que constataram maior ocorrência de *L. monocytogenes* na primavera, na Croácia. Por outro lado, Gombas et al. (2003), nos Estados Unidos, e Nakamura et al. (2004), no Japão, não detectaram diferença na positividade de amostras nestas estações do ano.

Em relação às cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas nesse estudo, todos os isolamentos ocorreram nos meses de verão. Esses dados são semelhantes aos relatados por Sandrini et al. (2007), no Brasil, que analisaram amostras de fezes de bovinos de leite, e relatam que a ocorrência de altas temperaturas, aparentemente, influenciou positivamente no número de animais infectados por cepas de STEC, favorecendo a sobrevivência e multiplicação de *E. coli* no ambiente, possibilitando sua disseminação entre os animais.

No presente estudo foi obtido o isolamento de 11 cepas (10,19%) de *Listeria* spp. distribuídas nas seguintes espécies: 2 *Listeria innocua* (1,86%), 7 *Listeria monocytogenes* (6,48%) e 2 *Listeria* sp. (1,86%). As cepas de *Listeria* sp. e *L.*

innocua foram isoladas no P1, quando os animais ainda estavam com couro; as cepas de *L. monocytogenes* foram isoladas no P1, P2 e P3.

Nos Estados Unidos, na análise de 2.089 carcaças de bovinos a frequência de *L. monocytogenes* foi de 4,1% (McNAMARA, 1995). Na Itália, Peccio et al. (2003), analisando carcaças bovinas, encontraram 19 % de amostras positivas para *L. monocytogenes*. No Brasil, Picchi et al. (1999) analisaram 25 amostras de quartos dianteiros desossados de bovinos provenientes de abatedouros sob Inspeção Federal no Estado de São Paulo e relataram a ocorrência de 96 % de *Listeria* spp. e 20 % de *L. monocytogenes* nas amostras.

De acordo com Rocourt (1994) a presença de *L. monocytogenes* em carcaças é usualmente atribuída à contaminação por matéria fecal durante o abate, sendo estimada uma alta porcentagem (11 a 52%) de animais portadores sadios. Algumas pesquisas sobre a ocorrência de *Listeria* spp., inclusive *L. monocytogenes*, em plantas de processamento de carnes também apontam o ambiente e os equipamentos como fontes de contaminação de carnes e produtos cárneos (BARROS et al., 2004; BARBALHO et al., 2005) o que pode sugerir que neste estudo a contaminação das carcaças por *L. monocytogenes* no P2 e P3 podem ter ocorrido devido a contaminação cruzada.

Apesar de *L. innocua* não ser patogênica para o homem, seu isolamento, assim como o de outras espécies, não deixa de ter interesse já que possui o mesmo habitat (trato gastrintestinal). Deste modo, sua presença pode também ser considerada confirmatória da presença de contaminação por *L. monocytogenes*, indicando falta de condições sanitárias satisfatórias durante o processamento do alimento (GUERRA et al., 1999). Neste estudo, o que foi constatado foi o isolamento de *L. innocua* e também o isolamento de *L. monocytogenes* em uma mesma coleta e no mesmo ponto avaliado (coleta 01), o que pode sugerir que a presença de *L. innocua* pode ser presuntiva de contaminação também por *L. monocytogenes*.

Os isolados de *L. monocytogenes* foram avaliados através da técnica de PCR multiplex, onde foram identificados dois sorotipos predominantes, o sorotipo 1/2a e o sorotipo 4b. Todas as cepas de *L. monocytogenes* apresentaram o gene de virulência *hlyA*, presente em cepas patogênicas e responsável pelo ciclo de infecção.

Todas as cepas patogênicas de *L. monocytogenes* são hemolíticas, sendo a hemolisina, uma proteína codificada pelo gene *hly*, considerado um dos principais fatores ligados à virulência (CRUZ et al., 2008). O gene *hly* foi o primeiro fator de virulência a ser determinado e sequenciado em *L. monocytogenes*, sendo necessário para a sobrevivência e proliferação desse micro-organismo nas células (GEDDA et al., 2000).

Em relação ao sorotipo 4b, Hofer et al. (2006), no Brasil, analisaram fenotipicamente cepas de *L. monocytogenes* isoladas durante os anos de 1969 a 2000 (255 amostras), em várias regiões do país, onde foi observado que o sorotipo 4b foi o mais frequente (60,3%) seguido pelo 1/2a (29%). Os autores destacaram ainda que as regiões Sul e Sudeste do Brasil apresentam o maior número de isolados de *L. monocytogenes* (87,8%), sugerindo que este fato possa estar associado a diferentes hábitos alimentares, o que chama a atenção em relação às cepas isoladas neste estudo onde, das onze cepas de *Listeria* sp. isoladas, sete (63,6%) foram sorotipificadas como *L. monocytogenes*, e os sorotipos 1/2a e 4b foram os predominantes.

Em relação ao perfil de resistência, todas as cepas de *L. monocytogenes* apresentaram resistência para ácido nalidíxico (100%) e para cefotaxima (100%) um grande número de isolados demonstrou resistência para cefoxitina (90,91%), clindamicina (90,91%) e sulfonamida (54,55%), demonstrando multirresistência. Atualmente, a ampicilina ou a penicilina G combinados com gentamicina, é o tratamento de referência para a listeriose humana. Além disso, também são utilizados trimetoprim-sulfametoxazol, vancomicina e eritromicina como segunda escolha para tratar a listeriose (HOF, 2004). Desde o primeiro isolamento de uma cepa multirresistente de *L. monocytogenes* que ocorreu na França em 1988 (POYART-SALMERON et al., 1990), o número de cepas resistentes a antimicrobianos tem aumentado continuamente (YAN et al, 2010; GRANIER et al, 2011)

As três cepas de *L. monocytogenes* 4b isoladas (A2P2, A5P2 e A14P2) apresentaram multirresistência no mínimo a quatro antimicrobianos, sendo que um dos isolados (A2P2) foi resistente a oito antimicrobianos, ácido nalidíxico, amicacina, gentamicina, estreptomicina, sulfonamida, cefotaxima, clindamicina e cefalotina. Em

um estudo realizado por Hofer et al. (1999) foi demonstrado que *L. monocytogenes* sorotipo 4b também foi resistente à clindamicina.

Uma cepa de *L. innocua* 6a (A9P1) foi resistente a ácido nalidíxico, amicacina, gentamicina, estreptomicina, sulfazotrim, cefotaxima, clindamicina, cefalotina e cefoxitina, demonstrando multirresistência frente a nove antimicrobianos testados. Multirresistência também foi verificada por cepa uma de *Listeria* sp. (A3P1), a qual demonstrou resistência a oito antimicrobianos, os mesmos confirmados para a cepa de *Listeria innocua* 6a (A9P1), havendo diferença somente em relação à estreptomicina e amicacina, onde este isolado se mostrou sensível, mas foi resistente para imipenem. Em um estudo realizado por Mantilla et al. (2008), no Brasil, utilizando cepas de *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina, foi avaliada a resistência antimicrobiana desses isolados frente a quinze antimicrobianos e foi detectado que cepas de *L. innocua* sorotipo 6a e 6b foram resistentes a grande maioria dos antimicrobianos testados, corroborando com a multirresistência visualizada neste estudo.

As espécies de *Listeria* isoladas por Yucel et al (2005) oriundas de amostras de carne bovina e produtos cárneos, foram resistentes a cefalotina e ácido nalidíxico, porém, exibiram susceptibilidade a cloranfenicol e tetraciclina, ao contrário do que foi demonstrado neste estudo com cepas de *Listeria* sp., as quais demonstraram resistência para cloranfenicol e tetraciclina. Na pesquisa realizada por Gonçalves (1998) foram isoladas cepas de *Listeria* spp. provenientes de amostras de carne de frango congeladas, resistentes a tetraciclina, cloranfenicol, além de todas as 246 cepas isoladas terem apresentado resistência aos antimicrobianos cefoxitina, cefalexina e cefolaxima que corroboram com este estudo.

Os níveis de resistência de cepas de *L. monocytogenes* variam e são influenciados pelo uso de antimicrobianos em diferentes áreas geográficas. Portanto, é necessário controlar a resistência aos antimicrobianos de *L. monocytogenes* em nível mundial (WANG et al., 2013).

Para que haja o controle da contaminação por *L. monocytogenes*, tanto nos alimentos quanto do ambiente e equipamentos, as indústrias devem empregar programas de higienização adequados e investir em métodos de detecção mais acurados, com o intuito de monitorar a presença do patógeno na planta, e quando

detectado, permitir a adoção de medidas que auxiliam a produção de alimentos inócuos (SILVA et al., 2003).

Nesta pesquisa a frequência de *Salmonella* spp. foi de 0,85% (1/108), onde foi isolada uma cepa de *S. Livingstone* em uma carcaça após a esfola e lavagem (P3), antes da refrigeração, resultado que se assemelha à outros resultados encontrados no Brasil e também em outros países. Este resultado é considerado fora do padrão microbiológico preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA- para carne “*in natura*”, RDC N°12 (BRASIL, 2001) que exige ausência de *Salmonella* sp. em 25g do alimento. Ransom et al. (2002), nos Estados Unidos, encontraram *Salmonella* spp. em 1,7% das carcaças estudadas. Positividade superior foi encontrada por Rivera-Betancourt et al. (2004), nos Estados Unidos, que detectaram este patógeno em cerca de 25% das carcaças pesquisadas. Azevedo (2009), no Brasil, verificou a presença de *Salmonella* spp em 2% das carcaças, após a lavagem, antes da refrigeração.

Em relação aos genes de virulência, a cepa de *S. Livingstone* isolada carregava o gene *invA*, semelhante ao demonstrado por Rowlands (2008), no Brasil, onde o gene *invA* foi encontrado em 100% dos isolados de *Salmonella* spp. Também por Skyberg et al. (2006) e Liu et al. (2006), nos Estados Unidos, reportaram uma ocorrência elevada de alguns genes de patogenicidade, inclusive *invA*, nos isolados obtidos de carnes e produtos cárneos.

A resistência a antimicrobianos detectada no isolado de *S. Livingstone* foi alta, mostrando uma multirresistência para vários antimicrobianos, onde o isolado foi resistente à ampicilina, clindamicina, cefalotina, cefoxitina, eritromicina, vancomicina, seis dos dezesseis antibióticos testados. Esse microrganismo apresentou perfil de resistência intermediária ao ácido nalidíxico. A resistência à ampicilina também foi detectada no estudo de Zhao et al. (2007), onde foram analisados 129 isolados e em 66% das cepas de *Salmonella* spp. e foi demonstrada a resistência à ampicilina. A resistência à cefalotina é esperada, porque é uma cefalosporina de primeira geração com baixa atividade contra bactérias Gram-negativas (SPINOSA et al., 2001). A salmonelose é geralmente uma doença auto limitante e, como tal, a terapia antimicrobiana não está prescrita, no entanto, infecções causadas por cepas de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos é uma preocupação da saúde pública e seu monitoramento é importante (ZOU et al., 2012).

Nos Estados Unidos e Europa, *S. Livingstone* foi identificada como causadora de infecções alimentares em humanos a partir de diferentes fontes (GUERIN et al., 2005; CDC, 2010). Na Europa, no período de fevereiro a julho de 2001, ocorreram os maiores surtos descritos na literatura causados por *S. Livingstone*. Os surtos ocorreram na Noruega, com 44 casos notificados e na Suécia com 16 casos, onde houve três óbitos e 22 pessoas hospitalizadas (GUERIN et al., 2005). Em uma pesquisa realizada no Brasil, por Tozetto (2006), no estado do Paraná, isolou uma cepa de *S. Livingstone* envolvida em casos de surto no período de 2002 a 2004 das amostras clínicas humanas.

Nessa pesquisa a frequência de isolamento de cepas de *E.coli* O157:H7 foi de 20,37% (22/108) nas amostras de carcaça bovina. Chapman et al. (1993), na Inglaterra, isolaram *E. coli* O157:H7 de 4% das 2.103 amostras de fezes de bovinos antes do abate. Dentre os animais positivos, sete amostras (30%) das 23 carcaças positivas para *swab* retal também apresentaram o sorotipo O157:H7 na carcaça após o abate. Além disso, 8% dos bovinos negativos nas fezes apresentaram contaminação por *E. coli* O157:H7 na carcaça. Isto indica que os bovinos são um reservatório de STEC, inclusive de *E. coli* O157, e que a contaminação da carcaça durante o abate ou processamento pode ser o meio pelo qual a carne e seus subprodutos se contaminam (GRIFFIN et al., 1991).

Na América do Sul, o Uruguai, o Chile e, especialmente, a Argentina apresentam prevalência de infecções humanas por STEC, principalmente o sorotipo O157:H7, e de casos de SHU relativamente altas, quando comparadas às dos países do hemisfério norte, fato que é atribuído aos hábitos alimentares e à alta prevalência de STEC, principalmente do sorotipo O157, em bovinos e em carne bovina (KAPER & O'BRIEN, 1998).

Na Argentina, a SHU é endêmica, onde aproximadamente 400 casos são notificados anualmente (RIVAS et al., 2006). Esta taxa é 10 vezes maior do que em outros países industrializados. Em geral, os casos de SHU são relatados como eventos esporádicos, no entanto, vários surtos foram descritos nos últimos anos (MILIWEBSKY et al, 2007). De acordo com pesquisa realizada por Gadea et al. (2012), no Uruguai, entre 2002 e 2008, foram notificados 36 casos de crianças com diagnóstico clínico de SHU, e em três casos, foram isoladas cepas de STEC dos sorotipos O157:H7.

Uma das preocupações do governo brasileiro é a possível disseminação de STEC, principalmente do sorotipo O157:H7, no Brasil. Esta disseminação pode ser favorecida pela presença do grande rebanho bovino no país, onde de acordo com Karmali et al. (2010) e Jeorg et al. (2013) o bovino é um portador assintomático e um importante reservatório deste agente patogênico que pode ser transmitido de animal para animal e através de alimentos contaminados, como a carne bovina. A proximidade do Uruguai e Argentina com o Brasil é um dos motivos de preocupação em relação a disseminação de STEC no rebanho bovino, principalmente do sorotipo O157:H7.

Vários estudos realizados no Brasil têm encontrado STEC em amostras de fezes de bovinos (CERQUEIRA et al., 1999; MOREIRA et al., 2003; IRINO et al., 2005; SALES et al., 2006; SANDRINI et al., 2007; STELLA et al., 2008; VICENTE et al., 2008). No estado do Rio de Janeiro, CERQUEIRA et al. (1999) avaliaram 197 amostras fecais de rebanhos bovinos, e verificaram a ocorrência de STEC em 71% das amostras. Em gado leiteiro, a frequência de isolamento foi de 82% e em gado de corte, 53%. Em pesquisa realizada no sul do Brasil, Moreira et al. (2003) observaram a ocorrência de STEC em 57 (95%) das 60 fazendas investigadas, e em 119 (49%) das 243 vacas, mesmo com alta frequência de cepas produtoras de *Stx*, não houve isolamento do sorotipo O157:H7.

Estudos demonstram que a presença de STEC no rebanho bovino brasileiro variou de 1,2 a 95%, dependendo da região estudada (CERQUEIRA et al., 1999; IRINO et al., 2005; HUSSEIN et al., 2005; SANDRINI et al., 2007). Rigobelo et al. (2006), pesquisando carcaças provenientes de bovinos confinados no Brasil, encontraram somente uma amostra positiva para STEC (1,2%), relatando altos níveis de resistência a múltiplas drogas desse isolado. A síntese desses estudos demonstra que cepas de STEC já foram isoladas no rebanho bovino brasileiro, a maioria em amostras de fezes, mas que ainda são escassos os relatos de isolamento do sorotipo O157:H7 em fezes e carcaças bovinas.

De acordo com Paton & Paton (2005) a utilização de *primers* específicos para *stx1* e *stx2* é suficiente para confirmar a presença de STEC na amostra. Neste estudo, das 21 cepas isoladas de *E. coli* O157:H7 e analisadas por PCR, oito cepas (38,10%) apresentaram os genes *stx2*, *eae* e *rfbO157*, oito cepas (38,10%)

apresentaram os genes *stx2* e *rfbO157*, quatro cepas (19%) foram positivas para os genes *stx1*, *stx2*, *eae* e *rfbO157* e uma cepa apresentou somente o gene *rfbO157*.

Irino et al. (2003), estudando amostras de *E. coli* isoladas de bezerros, no estado de São Paulo, observaram que 94% das STEC encontradas foram produtoras de Stx2 e apenas 6% foram produtoras de Stx1, fato que se assemelha aos resultados aqui detectados, onde 19% das cepas isoladas apresentaram o gene *stx1* e 95% apresentaram o gene *stx2*. Um estudo realizado por Irino et al. (2005) relatou que só foi possível verificar a presença do gene *eae* em 1% de amostras STEC, restrito ao sorotipo O157:H7, o que difere do encontrado neste estudo, onde a presença do gene *eae* foi detectado em 57% das cepas isoladas.

Em um estudo epidemiológico realizado por Parma et al. (2000), na Argentina, onde compararam padrões de virulência de sorotipos de *E. coli* O157 isolados de bovinos enviados para abate e em produtos cárneos foi observado que, a maioria das cepas virulentas isoladas foram encontradas em animais jovens, com perfil para o gene *stx2* e *eae* prevalente entre os isolados de bovinos em matadouro (18/33; 54,5%) e um perfil *stx1* e *eae* positivo para os isolados de bezerros saudáveis. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Blanco et al. (1996), na Espanha, e Banguetcoque et al. (1996), na Tailândia, e corroboram os resultados do presente estudo, onde as cepas isoladas foram na grande maioria de animais jovens e fêmeas, com a presença dos genes de virulência *stx1*, *stx2* e *eae*. Resultados semelhantes foram obtidos por Moreira et al. (2003), no Brasil, e por Kobayashi et al. (2001), no Japão, onde também foi relatado maior prevalência entre novilhos e vacas.

O estudo do perfil das toxinas de *E. coli* O157:H7 provenientes de isolados clínicos realizado por Ostroff et al. (1989) demonstrou que pacientes infectados com cepas portadoras do gene *stx2* foram quase sete vezes mais susceptíveis ao desenvolvimento de doença grave do que aqueles infectados com cepas portadoras de gene *stx1* ou *stx1/stx2*. Outro estudo determinou que Stx2 têm uma dose letal 50% menor que a Stx1 quando administradas a camundongos (BOERLIN et al., 1999). Por outro lado, o perfil toxigênico de cepas de STEC isoladas de pacientes chilenos com SHU ou diarreia aguda demonstrou que o genótipo predominante foi *stx1/stx2* ou apenas *stx1* (PRADO et al., 1995), em concordância com o perfil

genético predominante em STEC isoladas de pacientes com SHU descrito por Rios et al. (1999).

De acordo com Scheutz et al. (2012) uma observação muito importante nos últimos sete anos têm sido a associação entre cepas carreadoras dos gene *stx2a* e *eae* e as suas implicações com casos de SHU. Nataro et al. (1998) relataram que as cepas de STEC que possuem o gene *stx2* frequentemente transportam o gene que codifica o fator de aderência intimina (*eae*), que é uma proteína da membrana externa, o que não foi observado em algumas das cepas isoladas neste estudo, onde oito cepas apresentaram somente o gene *stx2* e *rfbO157*, não apresentando o gene *eae*.

Estudos têm demonstrado que existe um risco aumentado para o desenvolvimento de SHU, quando ambos os genes *stx2* e *eae* estão presentes nas cepas infectantes (BOERLIN et al., 1999; ETHELBERG et al., 2009). A frequência dessa combinação de genes detectada, no presente estudo, foi de 33,3%, ou seja, sete isolados.

Em relação ao ensaio de citotoxicidade em células Vero, 21 cepas (95,45 %) foram verotoxigênicas, expressando a toxina Shiga. Uma das cepas (4,75 %) não foi verotoxigênica, provavelmente, por não apresentar genes de patogenicidade *stx1* e *stx2*, somente o gene *rfbO157*, visualizado na PCR.

Embora o tratamento de infecções por *E. coli* O157:H7 com antibióticos seja contraindicado, numerosos estudos vem sendo realizados para avaliar os padrões de resistência a antimicrobianos (KARMALI et al., 2010). A resistência antimicrobiana é comum em *E. coli* O157 e outros sorotipos de STEC, incluindo a resistência a múltiplas drogas, como à estreptomicina, sulfisoxazole e tetraciclina (MORA et al., 2005; KARMALI et al., 2010), e há alguns indícios de que pode aumentar a resistência ao longo do tempo, devido ao uso intensivo de antimicrobianos (WHITE et al., 2002).

Alguns estudos demonstram uma maior taxa de resistência aos antimicrobianos em cepas de *E. coli* O157 isoladas de bovinos em comparação a cepas isoladas de surtos (MENG et al., 1998; SCHROEDER et al., 2002; MORA et al., 2005). Esses dados corroboram os demonstrados neste estudo, onde cinco cepas de *E. coli* O157:H7 (23,8%) isoladas das carcaças bovinas foram multirresistentes à vários antimicrobianos testados; uma das cepas demonstrou

resistência frente a oito antimicrobianos dos dezesseis testados, inclusive à estreptomicina. Todos os isolados (100%) apresentaram resistência para clindamicina, seis (28,6%) foram resistentes para ácido nalidíxico, dados estes que demonstram que a multirresistência de isolados de *E. coli* O157:H7 vêm crescendo consideravelmente, sendo uma preocupação em relação à saúde pública.

As 22 cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas neste estudo foram submetidas à digestão por enzima de restrição *Xba*I, seguida de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Através da comparação dos padrões de macrorrestrrição foram obtidos seis perfis de bandas (1 a 6). O perfil 1 foi o perfil que agrupou o maior número de cepas de *E. coli* O157:H7 (14 cepas), seguido pelo perfil 2 (3 cepas) e perfil 5 (3 cepas cada). As cepas A2 e A10P2 apresentaram perfil único (perfil 3 e 4).

Com a análise por PFGE foi observado que o perfil 1 agrupou três cepas de *E. coli* O157:H7, identificadas como A13P1, A13P2 e A13P3, as quais apresentaram as mesmas características genotípicas nos três pontos onde foram isoladas. As cepas foram isoladas do mesmo animal, mas em pontos diferentes do abate, no P1, animal com o couro, no P2, carcaça sem o couro (esfola) e no P3, meia carcaça, pronta para ser enviada para o resfriamento, sugerindo contaminação cruzada durante o processo de abate. Em relação às outras cepas do perfil 1, as quais foram amostradas no mesmo dia de coleta, mas em diferentes animais, pode sugerir um indicativo de contaminação cruzada no processamento, durante o transporte e/ou no início do abate.

Um resultado interessante no presente estudo é a semelhança fenotípica e genotípica das cepas A4P1 e A5P2 isolada das carcaças bovinas nesta pesquisa, no Brasil em 2012, e da cepa A13 isolada de um surto na Argentina, em 2005, utilizada como controle positivo neste estudo. Este resultado pode sugerir a transferência de tal clone de *E. coli* O157:H7 entre os países. No entanto, não é possível saber a origem dessa transferência, pois a mesma pode ter sido proveniente do Brasil sem ter sido detectada antes de 2005 ou pode ser proveniente da Argentina, sendo transferida através de turismo ou devido à importação de gado entre os países vizinhos.

A caracterização fenotípica e genotípica são ferramentas importantes nas investigações epidemiológicas, pois permitem elucidar surtos de DTA, e auxiliam na adoção de medidas preventivas para controle do agente patogênico. Para a indústria

de alimentos, a grande contribuição dos métodos de caracterização é a possibilidade de traçar a origem da contaminação do produto final, verificar a disseminação da contaminação e determinar os pontos de persistência de patógenos na linha de produção, visando à correção e adequação ou implantação de procedimentos operacionais de higienização mais adequados.

Como conclusão deste estudo, de acordo com as contagens de micro-organismos mesófilos e *E. coli*, observado nas carcaças analisadas, pode-se dizer que o mesmo demonstrou que o processo de abate nesta indústria, no período estudado, foi satisfatório em relação às contagens de micro-organismos indicadores para a garantia da inocuidade microbiológica das carcaças bovinas. A enumeração de micro-organismos indicadores ao longo do processo de abate como forma de monitoramento da contaminação é imprescindível para a indústria de processamento tecnológico da carne bovina. Em virtude da maior contaminação encontrada no couro dos animais, a etapa de esfolagem tem fundamental importância para a redução significativa de micro-organismos indicadores observada nas carcaças bovinas, uma vez que, a retirada do couro de forma higiênica garante uma drástica redução desta contaminação superficial das carcaças nas etapas seguintes do abate, o que foi visualizado neste estudo.

Neste trabalho ressalta-se o isolamento de patógenos, inclusive sorovares de *E. coli* O157:H7, em carcaças bovinas no Rio Grande do Sul. A carne bovina é de grande importância para economia interna e externa do estado, gerando empregos e renda, além de ser um dos alimentos de grande consumo pela população. Mesmo que as contagens de micro-organismos indicadores estivessem baixas durante as etapas do abate, o isolamento de patógenos mostra que as análises devem ser mais criteriosas e um maior monitoramento desses patógenos deve ocorrer como rotina nos frigoríficos. Em vista disso, a adoção de um sistema de monitoramento e de prevenção prático e eficiente é fundamental para evitar casos de surtos na população, além de evitar embargos à exportação de carne bovina do estado dos países importadores, devido aos patógenos isolados.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M.; WEGENER, H.C.; COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, n.6, p.733–50. <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.6.5.733>, 2008.
- AGUADO, V.; VITAS, A.I.; GARCÍA-JALON, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by FPD and REA. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.90, p.341-347, 2004.
- 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*, v.2, n.10, p.109-16, 2007.
- ANGELES, G. R. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México, México D.F.*, v.44, n.5, p.464-475, 2002.
- ARSLAN, S.; EYI, A. Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products. *Journal of Food Protection*. v.73, n.9, p.1613-1617. 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). Exportação de carne bovina no Brasil. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/download/EXP%20JAN%20-%20MAI%2010.pdf>. Acesso em: jun. 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). Exportações por ano – 2011. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp> Acesso em: junho de 2012.
- AZEVEDO, A.P. Prevalência e características de *Salmonella* spp. em carne bovina brasileira para exportação: contribuição para uma avaliação de risco. Dissertação de Mestrado, 84p, 2009. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ciências dos Alimentos.
- BADER, J.M. Source of listeriosis outbreaks in France. *Lancet*, 341-487, 1993.
- BAILEY, S.; RICHARDSON, L.J.; COX, N.A.; COSBY, D.E. *Salmonella*. In: JUNEJA, V.K.; SOFOS, J.N. *Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions*, cap.7, p.108-118, Washington, DC: ASM Press, 2010.
- BARROS, M.A.F.; BELOTI, V.; HAGA, M.M.; CAVALETTI, L.; d'OVIDIO, L.; AMORIM, F.A.; NERO, L.A. *Listeria* spp.: ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 25, n.4, p. 341-348, 2004.

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

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

BERRANG, M.E.; EINERSMANN, R.J.; FRANK, J.F.; SMITH, D.P.; GENZLINGER, L.L. Distribution of *Listeria monocytogenes* subtypes within a poultry further processing plant. Journal of Food Protection, v.68, n.5, p.980-985, 2005.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular no 272/97/DIPOA. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil, Brasília-DF, 22 dez. 1997, p. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa IN Nº 9/2009. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil, Brasília – DF,

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual para teste de *Escherichia coli* para verificação do controle de processos em estabelecimentos de abate de bovinos e suínos. Anexo à circular no 272/97/DIPOA. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil, Brasília – DF, 22 dez.1997. p.1, 7.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria Nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Disponível em: http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_2914-11.pdf. Acesso em: maio de 2012.

BACON, R.T.; BELK, K.E.; SOFOS, J.N.; CLAYTON, R.P.; REAGAN, J.O.; SMITH, G.C. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. Journal of Food Protection, v.63, n.8, p.1080-1086, 2000.

BOERLIN, P. Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. Cell Mol Life Sci. Basel, v.56, n.9-10, p.735-741, 1999.

BORDER, P.M.; HOWARD, J.J.; G.S. PLASTOW & K.W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, v.11, p.158-162, 1990.

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

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; GONZALEZ, E.A.; ALONSO, M.P.; MAAS, H.; JANSEN, W.H. Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). Eur J Epidemiol. v.12, p. 13-19, 1996.

CALDERWOOD, S. et al. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. ASM News, v.62, p.118-119, 1996.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. Microbiologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; p.229-34, 1999.

CARMO, G.M.I.; OLIVEIRA, A.A.; DIMECH, C.P.; SANTOS, D.A.; ALMEIDA, M.G.; BERTO, L.H.; ALVES, R.M.S.; CARMO, E.H. 2005. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico, 6: 1-7. <
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf>. Acesso: junho 2012.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (2010). One-day (24-28h) Standardized Laboratory Protocol for molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). In: PulseNet section 5.1, 5.2, 5.4, p.1-15.

CENSO AGROPECUÁRIO. 2006. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br> > Acesso: setembro. 2012.

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

CHAPMAN, P.A.; SIDDON, C.A.; WRIGHT, D.J.; NORMAN, P.; FOX, J.; CRICK, E. Cattle as a possible source of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. Epidemiology and Infection, Cambridge, v.111, p.439-447, 1993.

CHARPENTIER, E., GERBAUD, G., JACQUET, C., ROCOURT, J.; COURVALIN, P. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. Journal of Infectious Diseases 172: 277-281, 1995.

CHEN, J.; ZHANG, L.; PAOLI, G.C.; SHI, C.; TU, S.; SHI, X. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella* enterica from food using a target sequence identified

by comparative genomic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.137, n.2-3, p.168-174, 2010.

COLLARD J.M.; BERTAND, S.; DIERICK, K. et al. Drastic decrease of *Salmonella* Enteritidis isolated from humans in Belgium in 2005, shift in phage types and influence of foodborne outbreaks. *Epidemiol Infect.*, v.136, p.771–781, 2008.

COSTALUNGA S., TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 a 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33:342-6, 2002.

CRUZ, C.D.; MARTINEZ, M.B.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v.19, n.2, p.195-206, 2008.

DANIEL, A.; TADESSE, S. Z.; TONG, E.; SHERRY, A.; SINGH, A.; BARTHOLOMEW, M.J.; MCDERMOTT, P.F. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infectious Diseases* www.cdc.gov/eid ,v.18, n.5, May 2012.

DEFRANCESCO, K.A.; COBBOLD , R.N.; RICE, D.H.; BESSER, T.E.; HANCOCK, D.D. Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks. *Veterinary Microbiology*, v.98, p.55-61, 2004.

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

DESTRO, M.T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Applied Environmental Microbiology*, v.62, p. 705-711, 1996.

D'AUOST, 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.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.8, 2004.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington 3 ed, Washington: ASM, Press 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.

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

DUVAL, E.H. *Listeria* spp. no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.3, p. 911-916, 2004.

EDUARDO, M.B.; MELLO, M.L.R.; KATSUYA, E.M.; CAMPOS, J.C.; KITAGAWA, B. Y. Síndrome Hemolítico Urêmica – Normas e Instruções. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2002.

EUROPEAN COMMUNITIES - EC. (2001/471/EC). Official Journal of the European Communities, p.L165/48, 2001.

EPPINGER, M.; MAMMEL, M.K.; LECLERC, J.E.; RAVEL, J.; CEBULA, T.A. Genomic anatomy of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v.10, p.20142–20147, 2011.

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

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

EVES, A., DERVISI, P. Experiences of the implementation and operation of hazard analysis critical control points in the food service sector. *Hospitality Management*, 24: 3-19, 2005.

FAIRBROTHER, J.M.; NADEAU, E. *Escherichia coli*: on farm contamination of animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.25, n.2, p.555-569, 2006.

FAO/WHO - Microbiological Risk Assessment Series. 2005. Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Interpretative Summary: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra4_es.pdf. Acesso em 20 de julho de 2012.

FLUIT, A.C. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol Med Microbiol*. v.43, p.1–11; 2005.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de importância em Alimentos, In: *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, cap.4, p.33 – 82, 1996.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de alimentos*. São Paulo: Atheneu, cap.7, p.56-89, 2000.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, p.33-82, 2008.

FRANCO, B.D.M.F.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; CHIARINI, E.; AZEVEDO, A.P.; LOPES, G.V.; FOGO, V.S. Perigos e riscos microbiológicos em carne bovina. In: Bovinocultura de Corte. Piracicaba: FEALQ, v. II, cap.65, p.1305-1320, 2010.

FRANCHIN, P.R.; OGLIARI, P.J.; ANDRADE, D.F.; CHIAPINOTO, M.; LEMOS, G.; REBELATTO, M.; SILVA, I.G.; BATISTA, C.R.V. Comparison of the BAX system with an in-house MSRV method for the detection of *Salmonella* in chicken carcasses and pork meat. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v.37, n.4, p.521-526, 2006.

FRANÇA FILHO, A.T.; MESQUITA, A.J. et al. Qualidade bacteriológica de meias - carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. Ciência Animal Brasileira, v.7, n.3, p.315-325, 2006.

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

FOLEY, S.L.; ZHAO, S.; WALKER, R.D. Comparison of Molecular Typing Methods for the Differentiation of *Salmonella* Foodborne Pathogens. Foodborne Pathogens and Disease, v.4, p.253-276, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FAO. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook – *Escherichia coli* O157: H7. 2007. Disponível em <http://vm.cfsan.fda.gov/%7Emow/chap15.html>. Acesso em: 25 de Julho de 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. El estado mundial de la agricultura y la alimentacion. Roma: 2009. Texto disponível em <<http://www.rlc.fao.org/es/pubs/pdf/sofa.pdf> > acessado em junho de 2012.

FOOD STANDARS AGENCY - FSA. Sponge sampling of red meat carcasses. Disponível em: <<http://www.ukmeat.org/RedMeatCarcasses.htm>>. Acesso em: 15 junho 2012.

FORSYTHE, S.J. The microbiology of Safe Food. United Kingdon, Wiley-Blackwell, 2º ed., p.496, 2010.

FUKUSHIMA, H.; HOSHINA, K.; GOMYODA, M. Selective Isolation of *eae*-Positive Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, v.38 (4), p. 1684–1687, 2000.

GADEA, M.P. et al. Primer aislamiento em Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 em uma niña com síndrome urémico hemolítico. Revista Médica del Uruguay, v.20, p.79 - 81, 2004.

GADEA, M.D.P.; DEZA, N.; MOTA, M.I.; CARBONARI, C.; ROBATTO, M.; D'ASTEK, B.; BALSEIRO, V.; BAZET, C.; RÜGNITZ, G.; LIVRELLI, V.; SCHELOTTO, F.; RIVAS, M.; VARELA, G. Two cases of urinary tract infection caused by Shiga toxin-

producing *Escherichia coli* O157:H7 strains. Revista Argentina de Microbiologia. v.44, p. 94 - 96, 2012.

GASANOV, U., HUGHES, D.; HANSBRO, P. Methods for isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiological Review 29: 851-875, 2005.

GEBREYES, W.A.; THAKUR, S.; DORR, P.; TADESSE, D.A.; POST, K.; WOLF, L. Occurrence of *spvA* virulence gene and clinical significance for multidrug-resistant *Salmonella* strains. Journal of Clinical Microbiology, v.47, n.3, p.777-780, 2009.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Enteritidis Isolated from Foods Involved in Human Foodborne Outbreaks Occurred in the South of Brazil, 1999 to 2000. Journal of Food Safety, Estados Unidos, v. 1, p. 1-1, 2005.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.J.S. Agentes bacterianos de toxinfecções alimentares. In: Higiene e vigilância Sanitária de alimentos. São Paulo: Ed. Varela, p.199-258, 629 p., 2001.

GIL, J.I. Manual de Inspeção Sanitária de carnes. 2ed. Portugal: Fundação Caloust Gulbenkian, p.485, 2002.

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

GILL, C.O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In:_____. The microbiology of meat and poultry. Londres: Blackie Academic & Professional, cap.4, p.119-157, 1998.

GILL, C.O.; MCGINNIS, J.C. Contamination of beef trimmings with *Escherichia coli* during a carcass breaking process. Food Research International, Barking, v.33, p.125-130, 2000.

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

GOMBAS, D. E.; CHEN, Y.; CLAVERO, R. S.; SCOTT, V. N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Journal of Food Protection, Des Moines, v. 55, n. 4, p. 559-569, Apr. 2003.

GONÇALVES, P. M. R. Isolamento e identificação de *Listeria* spp. a partir de amostras de cortes de peito de frango congelados: avaliação de metodologias e fatores interferentes. Niterói, RJ, 1998. 111 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ, 1998.

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

GRANIER, S.A., MOUBARECK, C., COLANERI, C., LEMIRE, A., ROUSSEL, S., DAO, T.T., et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. Applied and Environmental Microbiology, v.77, p.2788-2790, 2011.

GRAU, F.H. Microbial ecology of meat and poultry. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. (ed.). Advances in meat research: meat and poultry microbiology. Westport: AVI Publish, 1986. v.2, cap.1, p.1 - 47.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V.; The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev. Warsaw, v.13, p.60-98, 1991.

GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: BLASER, M.J.; SMITH, P.D.; RAVDIN, J.I.; GREENBERG, H.B.; GUERRANT, R.L. (Ed). Infections of the gastrointestinal tract. New York, p.739-761, 1995.

GUERRA, M.M.M.; BERNARDO, F.M.A Ocorrência Natural de *Listeria* spp. em Queijos Alentejanos (Portugal). Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. XCIV, n. 531, p.142-1 47, 1999.

GUERIN, M.T.; MARTIN, S.W.; DARLINGTON, G.A.; RAJIC, A. A temporal study of *Salmonella* serovars in animals in Alberta between 1990 and 2001. Can. J. Vet. Res., v.69, p.88-99, 2005.

GUSTAFON, R.H.; BOWEN, R.E. Antibiotic use in animal agriculture. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v.83, p.531-541, 1997.

GUTH, B.E.C., DE SOUZA, R.L., VAZ, T.M.I.; IRINO, K. First Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolate from a Patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil Emerging Infectious Diseases, v.8, n.5, 2002.

GUEDES, J.S. Investigação de *Listeria* sp. e micro-organismos mesófilos totais em carcaças bovinas em ambiente industrial de abatedouro frigorífico. Dissertação (mestrado) - 2010 – UFRGS. Porto Alegre, RS – Brasil.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEIL, F.X. Supplement 2003 – 2007 (nº 47) to the White – Kauffmann – Le Minor Scheme. Research in Microbiology. V. 161, p.26–29, 2010.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M.L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A.M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of

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

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. Toxinfecção e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos. 6ª ed. São Paulo: Varela, 377 p., 1999.

HOFER, E. Study on *Listeria* spp. on vegetables suitable for human consumption. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador, Resumos, 1975.

HOFER, E.; PÓVOA, M.M. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em solos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.79, n.1 p.45-53, 1984.

HOFER, C.B.; MELLES, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.41, n.6, p.375-377, 1999.

HOFER, E.; REIS, C.M F.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [online], v.39, n.1, p.32-37, 2006.

HOF, H. An update on the medical management of listeriosis. Expert Opinion on Pharmacotherapy, v.5, p.1727-1735, 2004.

HOLT, J.G. et al., Facultatively anaerobic Gram negative. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th. Baltimore: Willians e Wilkins, 787 p., Group 5, p. 175-197. 1994.

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

HUTTEN, G.; MORAES, I.A. Síndrome Enterohemorrágica: *Escherichia coli* O157:H7. SMS-RIO SCZ/Boletim de Divulgação Técnica e Científica, Rio de Janeiro, ano 2, n.5, p.6-7, 2000.

INTERNACIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, p. 361, 1997.

IRINO, K., VAZ, T.M.I., KATO, M.A.M.F. , NAVES, Z.V.F., LARA, R.R., MARCO, M.E.C., ROCHA, M.M.M., MOREIRA, T.P., GOMES, T.A.T. AND GUTH, B.E.C. O157:H7 ShigaToxin-Producing *Escherichia coli* Strains Associated with Sporadic Cases of Diarrhea in São Paulo, Brazil. Emerg. Infect Dis. Abril; 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, Amsterdam, v.105, n.1, p.29-36, 2005.

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

JACEWICZ, M.S., ACHESON, D.W., MOBASSALEH, M., DONOHUE-ROLFE, A, BALASUBRAMANIAN, K.A., KEUSCH, G.T: Maturational regulation of globotriaosylceramide, the Shiga-like toxin 1 receptor, in cultured human gut epithelial cells. *J Clin Invest.*,96:1328-35, 1995.

JACQUET, C.; CATIMEL, B.; GOULET, V. Typing of *Listeria monocytogenes* during epidemiological investigations of the French listeriosis outbreaks in 1992, 1993 and 1995. In: Proceedings of the XII International Symposium on Problems of Listeriosis. Western Australia, p.161 - 176, 1995.

JACQUET, C., GOUIN, E., JEANNEL, D., COSSART, P.; ROCOURT, J. Expression of *ActA*, *Ami*, *InlB*, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.616–622, 2002.

JACQUET, C. et al., A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J. Infect. Dis.*, v.189, n.11, p.2094-2100, 2004.

JARDIM, F. B. B.; SILVA, E. N.; OKURA, M. H.; RAMOS, M. A. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 2, p. 277-282, 2006.

JEONG, K.C.; HIKI, O.; KANG, O.Y.; PARK, D.; KASPAR, C.W. Prevalent and persistent *Escherichia coli* O157:H7 strains on farms are selected by bovine passage. *Veterinary Microbiology*, v.162, p.912–920, 2013.

JEYALETCHUMI., P.; TUNUNG, R., MARGARET, S.P.; SON, R.; FARINAZLEEN, M.G.; CHEAH, Y.K. Review Article - Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Food Research Journal*, v.17, p.1-11, 2010.

KARMALI, M.A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, p.15-37, 1989.

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

KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. Washington, USA: ASM, p.459, 1998.

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

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

KÉROUANTON, A.; MARAULT, M.; PETIT, L.; GROUT, J.; DAO, T.T.; BRISABOIS, A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*, Trumbull, v.80, n.2, p.134-137, 2010.

KOBAYASHI, H.; SHIMADA, J.; NAKAZAWA, M.; MOROZUMI, T.; POHJANVIRTA, T.; PELKONEN, S.; YAMAMOTO, K. Prevalence and Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl Env Microbiol.* v.67, n.1, p.484-489, 2001.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v.18, p.775-779, 1977.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, v.1, 1984.

LAILLER, R. et al. Subtyping of *Salmonella* Typhimurium by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types. *Pathology Biology*, v.50, p.361-368, 2002.

LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M.; KIRSCHBAUM, C.R.A.; MARCHI, C.R. Surto de meningite por *Listeria monocytogenes*. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, 58, n.1, p.63-67, 1999.

LANDGRAF, M. Microrganismos indicadores. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. (Ed.). *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, cap. 3, p.27-32, 2008.

LARSEN, C.N. In vitro and in vivo invasiveness of different pulsed-field gel electrophoresis types of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, n.11, p.5698-5703, 2002.

LÁZARO, N.S. Caracterização de sorovares de *Salmonella* em suínos abatidos no Estado do Rio de Janeiro e no ambiente de abatedouro. Rio de Janeiro, 1999 – Tese (Doutorado em Ciências Microbiológicas) Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1999.

LAWRIE, R.A. *Ciência da Carne* – 6ª edição – Porto Alegre: Artmed, p.148 – 152, 2005.

LOESNER, M., GUENTER, S., STEFAN, S., SCHERER, S. A pediocin producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 1854–1857, 2003.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, v.55, p.645-659, 2006.

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.

MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; SANTOS, E.B.; GOUVÊA, R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v.45, n.2, p.116-121, 2008.

MARGALL, N.; DOMÍNGUEZ, A.; PRATS, G.; SALLERAS, L. *Escherichia coli* enterohemorrágica. Revista Espanola de Salud Pública, Madrid, v.71, n.5, p.437-443, 1997.

MARTÍNEZ, B.; CELDA, M.F.; MILLÁN, M. E.; ESPACIO, A.; CANO, M.; LÓPEZ-MENDOZA, M.C. Assessment of the microbiological conditions of red-meat carcasses from bacterial counts recovered by sampling via excision or swabbing with cotton wool. International Journal of Food Science and Technology, v.44, p.770-776, 2009.

MASSUQUETTI, A.; RIBAS, R.J. O gado de corte no Rio Grande do Sul: Principais Sistemas de Produção. SOBER - XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco – Acre, 20 a 23 de julho de 2008.

MCFADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria.3.ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, v.43, p.544-545, 2000.

MCLAUCHLIN, J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v.9, n .3, p.210-213, 1990.

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

MERCADO, E.C. Síndrome Urémico Hemolítico: ¿por qué Argentina? Revista Argentina de Microbiología , v.39, p.191 - 192, 2007.

McNAMARA, A. M. Establishment of baseline data on the microbiota of meats. Journal of Food Safety, v.15, p.113-119, 1995.

MILIWEBSKY, E., DEZA, N., CHINEN, I., MARTÍNEZ ESPINOSA, E., GOMEZ, D., PEDRONI, E., CAPRILE, L., BASCHKIER, A., MANFREDI, E., LEOTTA, G., RIVAS, M. Prolonged fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children attending day-care centers in Argentina. Revista Argentina de Microbiologia 39, 90–92, 2007.

MORA, A.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J.; Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains

isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology*, v. 156, p.793–806, 2005.

MOREIRA, C.N.; PEREIRA, M.A.; BROD, C. S.; RODRIGUES, D.P.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from healthy dairy cattle in Southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.93, n.3, p.179-183, May 2003.

MMWR/CDC- MORBIDITY MORTALITY WEEKLY REPORTS. Preliminary FoodNete Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly through Food – 10 sites, United States, 2004. April 15, 2005, v.54, p.352-356. Disponível em: <<http://www.cdc.gov./mmwr/>>, Acesso em 20 de julho de 2012.

MMWR - Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks—United States, 2007. *MMWR - Morb Mortal Wkly Rep* 2010;v.59, p.973–979.

NAKAMURA, H.; HATANAKA, M.; OCHI, K.; NAGAO, M.; OGASAWARA, J.; HASE, A.; KITASE, T.; HARUKI, K.; NISHIKAWA, Y. *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 323– 328, 2004.

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

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

NATARO, J.P. *Escherichia coli*. In: Long, S.S.; Pickering, L.K.; Prober, C.G: *Principles and Practice of Pediatrics Infectious Diseases*, 3 ed. Churchill Livingstone: Elsevier, p.796-9, 2008.

O'BRIEN, A. D; LAVECK, G. D.; THOMPSON, M. R.; FORMAL, S. B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, v.146, p.763-769, 1982.

O' BRIEN, A.D.; LIVELY, T.A.; CHANG, T.W.; GORBACH, S.L. Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. *Lancet*, v. 2, p. 573, 1983.

O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev*. Washington, v.51, p.206-220, 1987.

OLIER, M. et al., Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. *Microbiology*, v.148, n.6, p.1855-1862, June 2002.

OLIVEIRA, F.A., BRANDELLI A., TONDO, E.C. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human Salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *The New Microbiological*, 29:49-5, 2006.

OLIVEIRA, F. A.; GEIMBA, M. P.; BRANDELLI, A.; SILVA, W. P.; PASQUALI, G. ; TONDO, E. C. Clone relationship among *Salmonella* enterica serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in southern Brazil. *Food Control*, v. 20, p. 606-610, 2009.

OLIVEIRA, A.B.O.; PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M.R.I.; TONDO, E. C. Doenças Transmitidas por Alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *Revista HCPA (UFRGS-Impresso)*, v.30, p.279-285, 2010.

OLSEN, J.E. et al. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis: applications in investigations of Salmonellosis among livestock. *The Veterinary Quarterly*, v.15, n.4, p.125-135, 1993.

ORDOÑEZ, J.G.; TRABULSI, L. R. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). In:_____. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, cap.37, p.285-288, 2005.

OSTROFF, S.M.; KOBAYASHI, J.M.; LEWIS, J.H. Infection with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. *J Amer Med Assoc*. v.262, p.355-359, 1989.

OSTROFF, S.M. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic Sequelae in *Escherichia coli* O157: H7 infections. *J. Infect Dis*. Chicago, v. 160, p. 994-999, 1989.

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

PATON, A.W.; PATON, J.C. Direct and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb o111* and *rfbo157*. *J Clin Microbiol*. Washington, v.36, n.2, p.598-602, 1998.

PATON, A.W.; PATON, J.J. Multiple PCR for direct detection of shiga Toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.6, p.2944-2947, 2005.

PARDI, M.C.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*. VI *Ciência e Higiene da Carne – Tecnologia e sua Obtenção e transformação*. Universidade Federal Fluminense. EDUFF – Ed. Universitário, 623 p., 2001.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. Aspectos higiênico-sanitários da carne. In:_____. Ciência, higiene e tecnologia da carne, part. 4, v.1 (Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação), 2.ed., Goiânia: UFG, p.271-490, 2006.

PARMA, A.E.; SANZ, M.E.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; VINÃS, M.R.; M. BLANCO, M.; N.L. PADOLA, N.L.; ETCHEVERRÍA, A.I. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina - Importance in public health. *European Journal of Epidemiology*,v.16, p.757-762, 2000.

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

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.

PICKERING, L.K.; OBRIG, T.G.; STAPLETON, F.B. Hemolytic -uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v.13, p.459 - 476, 1994.

POYART-SALMERON, C.; CARLIER, C.; TRIEU-CUOT, P.; COURTIEU, A.L.; COURVALIN, P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *The Lancet*, v.335, p.1422-1426, 1990.

PRATA, C.B.; FRANCO, M.V. et al. A possível presença de *E. coli* O157:H7 em dejetos e carcaças de bovinos. *Revista Nacional da Carne*, v.383, p.88-93, 2009.

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

PICCHI, V.; RAMOS SILVA, E.O.T.; SOUZA, S.L.P.; BALIAN, S.C. Isolamento e identificação de *Listeria* spp., em quartos dianteiros de bovinos desossados. *Higiene Alimentar*, v.13, n.63, p.38-42, 1999.

RANGEL, J. M.; SPARLING, P. H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P. M.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis.*, p.11:603–9, 2005.

RANSOM, J.R.; BELK, K.E.; BACON, R.T.; SOFOS, J.N.; SCANGA, J.A.; SMITH, G.C. Comparison of sampling methods for microbiological testing of beef animal rectal/ clonal feces hides and carcasses. *Journal of Food Protection*, v.65, p.621-626, 2002.

RELATÓRIOS ANUAIS de ETA. Secretaria Estadual de Saúde e do Meio Ambiente. Divisão de Vigilância Sanitária, p.1987-2000. Porto Alegre, 2000

ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes* -The state of the science. Dairy Foods Environm. Sanit., v.14, p.70-82, 1994.

ROWLANDS, R.E.G., 2008. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de virulência em cepas de *Salmonella* spp isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares. (Dissertação). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ciências dos Alimentos.

RIBOT, E.M.; FAIR, M.A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D.N.; HUNTER, S.B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T.J. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. Foodborne Pathogens and Disease, v.3, n.1, 2006.

RIGOBELLO E.C.; STELLA, A.E.; ÁVILA, F.A.; MACEDO, C.; Marin, J.M. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. Inter. J. Food Microbiol., 110: 194-198, 2006.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; McGee, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P. A.; CHOEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. New Eng J. Med. London, v.308, n.12, p.681-685, 1983.

RIOS, M.; PRADO, V.; TRUCKSIS, M.; ARELLANO, C.; BORIE, C.; ALEXANDRE, M.; FICA, A.; LEVINE, M.M. Clonal diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. Journal of Clinical Microbiology, v.37, n.3, 778-781, 1999.

RIVAS, M. et al. Home-prepared hamburger and sporadic Hemolytic Uremic Syndrome, Argentina. Emerging Infectious Diseases, v.9, n.9, p.1184 - 1186, 2003.

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. The Case – Control Study Group. 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, p.88–96, 2006.

RIVAS, M., SOSA-ESTANI S., RANGEL, J., CALETTI, M.G., VALLÉS, P., ROLDÁN, C. D., BALBI, L., MARSAN O DE MOLLAR, M.C., 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, p.763, 2008.

RIVERA-BETANCOURT, M.; SHACKELFORD, S.D.; ARTHUR, T.M.; WESTMORELAND, K.E.; BELLINGER, G.; ROSSMAN, M.; REAGAN, J.O.; KOOHMARAIE, M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*,

and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*, v.67, n.2, p.295-302, 2004.

RIVERO, A.M., et al. Factors Associated with Sporadic Verotoxigenic *Escherichia coli* Infection in Children with Diarrhea from the Central Eastern Area of Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.8, n.8, 2011.

RUBY, J.R.; INGHAM, S.C. Use of Enterobacteriaceae analysis results for predicting absence of *Salmonella* serovars on beef carcasses. *Journal of Food Protection*, v.72, n.2, p.260-266, February 2009.

RYSER, E.T.; MARTH. E.H. *Listeria*, Listeriosis and food safety. 3rd edition, Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, 2006.

SANDRINI, C.N.M.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.1, p.175-182, 2007.

SANTOS, D.M.S.; BERCHIERI, A. Jr.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.20, p.39-42, 2000.

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; FLORES, M.L. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares ocorridas entre 1995 e 1996, no Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar*, v.16 (102/103), p.93-99, 2002.

SCHROEDER, C.M. et al. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.2, p.576-581, 2002.

SENCZEK, D.; STEPHAN, R.; UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over two-year period. *International Journal of Food Microbiology*, v.5, n.62, p.155-159, 2000.

SILVA, N.; EIROA, M.N.U. Avaliação do meio semi-sólido de Rappaport-Vassiliadis modificado para detecção rápida de *Salmonella* em Alimentos. *Coletânea ITAL*, Campinas, v.23, p.68-77, 1993

SILVA, M.C.D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, v.61, n.3, p.354-356, 1998.

SILVA, W.P.; LIMA, A.S.; GANDRA, E.A.; ARAÚJO, M.R.; MACEDO, M.R.P.; SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environmental of Minas Frescal cheese processing. *International Journal of Food Microbiology*, v.81, p. 241-248, 2003.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. Mercado veterinário por classes terapêuticas e mercado veterinário por espécie animal: < <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. Acesso: 15 outubro de 2011.

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

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

SCHEUTZ, F.; TEEL, L.D.; BEUTIN, L.; PIÉRARD, D.; BUVENS, G.; KARCH, H.; MELLMANN, A.; CAPRIOLI, A.; TOZZOLI, R.; MORABITO, S.; STROCKBINE, N.A.; et al. Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, v.50, n.9, p.2951–2963, 2012.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg Infect Dis.*, v.17, p.7–15, 2011.

STEVENS, A.; KEROUANTON, A.; MARAULT, M.; MILLEMANN, Y.; BRISABOIS, A.; CATTEAU, M.; CAVIN, J.F.; DUFOUR, B. Epidemiological analysis of *Salmonella* enterica from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. *International Journal of Food Microbiology*, v.123, p.191-197, 2008.

SKYBERG, J.A.; LOGUE, C.M.; KOLAN, L.K. Virulence Genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. *Avian Diseases*. V.50, n.1, p.77-81, 2006.

STELLA, A.E. et al. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *E. coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, v.15, n.1, p.66 -74, 2008.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. Beta-Lactam antibiotics: penicillins and cephalosporins. In: *Applied Pharmacology for Veterinary Medicine*. 3th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 752, 2001.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. Resistência Bacteriana a Droga. In: TRABULSI, L.R. *Microbiologia*. 2ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 1989. 386p. cap.13, p.86-89. 1989.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 718p.

TONDO, E.C.; RITTER, A.C. *Salmonella* and salmonellosis in Southern Brazil: a Review of the last decade. In: *Salmonella: Classification, Genetics and Disease Outbreaks*. Chapter 7. Nova Science Publishers, Inc., 2012.

TOZETTO, S.M. Sorotipos e Tipagem molecular de isolados de *Salmonella* entérica no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, 2006.

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

UNTERMANN, F.; STEPHAN, R.; DURA, U.; M. HOFER, M.; HEIMANN, P. Reliability and practicability of bacteriological monitoring of beef carcass contamination and their rating within a hygiene quality control programme of abattoirs. *International Journal of Food Microbiology*, v. 34 (1), p. 67–77, January 1997.

VAN ASTEN, A.J; VAN DIJK, J.E. Distribution of classic virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol*; v.44, p.251–259, 2005.

VICENTE, H.I.G., AMARAL, L.A., MELO, P.C., FERREIRA, L.M. Isolamento de Cepas de *Escherichia coli* shigatoxigênicas sorogrupos O157 e O111 por separação Imunomagnética após detecção por PCR (Nota de Pesquisa). *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.3, p.753-758, 2008.

VOLD, L. et al. Occurrence of shigatoxinogenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. *Epidemiology and Infection*, Cambridge, v.120, p.21-28, 1998.

YAN H.; NEOGI, S. B.; MO, Z.; GUAN, W.; SHEN, Z.; ZHANG S., LI, L.; YAMASAKI, S.; SHI, L.; ZHANG, N. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005-2007. *International Journal of Food Microbiology*, v. 114 (2), p. 310 - 316, 2010.

YANG, S J. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enterica serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Veterinary Microbiology*, v.86, p.295-301, 2002.

YOSHIDA T., SATO M., HIRAI K. Prevalence of *Listeria* species in raw milk from farm bulk tanks in Nagano prefecture. *The Journal of Veterinary Medical Science* v.60, n.3, p.311-314, 1998.

YOSHITOMI, K.J.; JINNEMAN, K.C.; WEAGANT, S.D. Detection of shiga toxin genes stx1, stx2, and the +93 uidA mutation of *E. coli* O157:H7/H-using SYBR® Green I in a real-time multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes*, Londres, v.20, n.1, p.31-41, 2006.

YUCEL, N.; CITAK, S.; ONDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food Microbiology*. v.22, p.2-3, 2005.

ZOU, M.; KEELARA, S.; THAKUR, S. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans by Antimicrobial Resistance,

Virulence Genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 9, n.3, 2012.

ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.F.; WHITE, D.G.; QAIYUMI, S.; FRIEDMAN, S.L.; ABBOTT, J.W.; GLENN, A.; AYERS, S.L.; POST, K.W.; FALES, W.H.; WILSON, R.B.; REGGIARDO, C.; WALKER, R.D. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. *Veterinary Microbiology*, v.123, p.122-132, 2007.

ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Microbiological monitoring of sheep carcass contamination in three swiss abattoirs. *Journal of Food Protection*, Ames, v.66, n.6, p.946 - 952, 2003.

ZWEIFEL, C.; FISCHER, R.; STEPHAN, R. Microbiological contamination of pig and cattle carcasses in different small-scale Swiss abattoirs. *Meat Science*, Barking, v.78, n. 3, p.225-231, 2008.

WANG, X.M.; LÜ, X.F.; YIN, L.; LIU, H.F.; ZHANG, W.J.; SI, W.; YU, S.Y.; SHAO, M.L.; LIU, S.G. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. *Food Control*, v.32, p.153-158, 2013.

WIEDMANN, M., Bruce, J.L., Knorr, R., Bodis, M., Cole, E.M., McDowell, C.I., McDonough, P.L.; Batt, C.A. Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, p.1086–1090, 1996.

WHITE, O.G.; et al. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes and Infection*, v.4, p.405-412, 2002.

W.H.O. - 1998. WHO/CSR/APH/98.8. Zoonotic Non - O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. Berlin, Germany, 23- 26 June 1998. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_CSR_APH_98.8.pdf>. Acesso em 25 junho 2012.