

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PESQUISA DE ESCHERICHIA COLI PRODUTORA DE SHIGA TOXINA (STEC)
EM CARCAÇAS DE AVES COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE XANXERE-
SC**

MARISETE FOCESATTO CERUTTI

PORTO ALEGRE

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PESQUISA DE ESCHERICHIA COLI PRODUTORA DE SHIGA TOXINA (STEC)
EM CARCAÇAS DE AVES COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE XANXERÊ-
SC**

Autora: Marisete Fochesatto Cerutti

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias, com ênfase em
Bacteriologia.**

**Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de
Itapema Cardoso**

PORTO ALEGRE

2018

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

C418p Cerutti, Marisete F.

Pesquisa de *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina (STEC) em carcaças de aves comercializadas no Município de Xanxerê - SC. / Marisete Cerutti; orient. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso – Porto Alegre: UFRGS, 2018.

64 f. : il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2018.

1. Bacteriologia 2. Carne de frango 3. Coliformes 4. Escherichia coli
I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, Orient. II. Título

CDD 616.07581

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Marisete Fochesatto Cerutti

**PESQUISA DE ESCHERICHIA COLI PRODUTORA DE SHIGA TOXINA (STEC)
EM CARCAÇAS DE AVES COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE XANXERÊ -
SC**

Aprovado em

APROVADO POR

Prof^a. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Orientadora e membro da Comissão

APROVADO POR

Prof^a. Dra. Franciele Maboni
Membro da Comissão

APROVADO POR

Prof^a. Dra. Andrea Troller Pinto
Membro da Comissão

APROVADO POR

Dr. Eduardo Freitas Costa
Membro da Comissão

Dedico este trabalho as minhas filhas,
Stefania, Marcelle e Camille e ao meu marido
Valmir Cerutti pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha professora e orientadora Dra. Marisa Cardoso por ter me guiado rumo a novos conhecimentos e por sua grandeza de pessoa, profissional e suporte, sem o qual esta pesquisa não se realizaria. À Dra. Caroline Pissetti pelas orientações e dedicação de estar sempre ao meu lado!

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS pelo trabalho colaborativo na realização deste projeto. Agradeço em especial Karoline Silva Zenato, Gabriela Werlang, Tatiana Vieira pela dedicação na execução deste projeto, contribuições e paciência e aos amigos e amigas do laboratório pelo atendimento e carinho.

Agradeço à Dra. Ivone Delazari, minha guia de vida e de profissão, por seu exemplo e apoio incondicional para a continuidade dos meus estudos e nos momentos difíceis da vida. Meu muito obrigada, também, aos meus diretores, Sérgio Mobaier, que entendeu o sonho do mestrado e me permitiu ingressar, e à Suely Kamei que me permitiu concluir. Meu especial agradecimento ao meu marido, Valmir Cerutti, por ser pai e mãe nas minhas ausências, pela presença ao meu lado durante a pesquisa e escrita e às minhas filhas, Stefania, Marcelle e Camille pela compreensão e apoio.

Agradeço aos meus pais. Elydia (in memoria) e Armindo Fochesatto pela vida, educação e por sempre me apoiarem na busca e concretização dos meus objetivos.

RESUMO

O consumo crescente de carne de aves requer uma contínua atenção na provisão de alimentos seguros para o consumidor. Entre os agentes emergentes de relevância para a Saúde Pública destaca-se a *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina (STEC), causadora de severa colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. Apesar da importância deste microrganismo na carne de ruminantes, sua presença em carne de aves tem sido pouco investigada. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de STEC em carcaças de aves congeladas comercializadas na cidade de Xanxerê/SC. Um total de 246 carcaças adquiridas em oito supermercados da cidade, de acordo com a disponibilidade na gôndola, foi submetido à rinsagem individual com água peptonada tamponada 1% e submetida à enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* e pesquisa de STEC pelo protocolo descrito na ISO/TS 13136:2012(E). Após 24 horas de incubação de uma alíquota da rinsagem a 36°C, foi realizada a pesquisa de genes de virulência (*stx1*, *stx2* e *eae*) por PCR multiplex. Das carcaças amostradas, a maioria era frango “in natura” (57%), seguidos de galinha (16%), galeto (15%), frango temperado (11%) e frango caipira (2%). A enumeração de coliformes totais no líquido de rinsagem resultou em mediana de 5,2 UFC.g⁻¹ (variando de 1 a 2.836,1 UFC.g⁻¹) e de *Escherichia coli* foi 0,6 UFC.g⁻¹ (variando de 1 a 242 UFC.g⁻¹), demonstrando uma qualidade higiênico-sanitária satisfatória do produto. Todos os líquidos de rinsagem originados das 246 carcaças avaliadas foram negativos para os genes *stx1* e *stx2*, indicando ausência de STEC nas amostras. Em 12 carcaças (4,88%) foi confirmada a presença de *E.coli eae+*, indicando a presença do patotipo enteropatogênico (EPEC). Conclui-se que as carcaças de aves comercializadas em Xanxerê apresentam um padrão higiênico sanitário adequado e ausência de STEC considerando uma prevalência detectável de 1,5% na amostra analisada. Por outro lado, detectou-se a presença de EPEC, a qual deve ser investigada para caracterizar as cepas encontradas em termos de potencial importância para a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Carne de frango. Coliformes totais. *E. coli*. STEC. EPEC

ABSTRACT

*The increasing consumption of poultry meat requires continued attention in the provision of safe food for the consumer. Emerging agents of relevance to Public Health include Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC), which causes severe hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. Despite the importance of this microorganism in beef, its presence in poultry meat has been few investigated. The present study aimed to evaluate the occurrence of STEC in frozen poultry carcasses marketed in the city of Xanxerê/SC. A total of 246 carcasses purchased from eight city supermarkets, according to on-shelf availability, was submitted to individual rinsing with 1% buffered peptone water and submitted to enumeration of total coliforms and **Escherichia coli** and STEC detection by the protocol described in ISO / TS 13136: 2012 (E). After 24 hours of incubation at 36 ° C an aliquot of the rinsing, virulence gene (**stx1**, **stx2** and **eae**) were investigated by multiplex PCR. Of the carcasses sampled, the majority were fresh poultry meat (57%), followed by chicken (16%), young chicken (15%), seasoned poultry meat (11%) and “caipira” type chicken (2%). The enumeration of total coliforms in the rinsing liquid resulted in a median of 5.2 CFU.g⁻¹ (ranging from 1 to 2836.1 CFU.g⁻¹). The median of **Escherichia coli** was 0.6 CFU.g⁻¹ (ranging from 1 to 242 CFU.g⁻¹), demonstrating a good sanitary and hygienic quality of the product. All rinse liquids from the 246 carcasses tested were negative for the **stx1** and **stx2** genes, indicating absence of STEC in the samples. In 12 carcasses (4.88%) the presence of **E.coli eae** + was confirmed, indicating the presence of the enteropathogenic pathotype (EPEC). It is concluded that the poultry carcasses marketed in Xanxerê have an good hygienic sanitary standard and absence of STEC considering a detectable prevalence of 1.5% in the sample analyzed. On the other hand, we detected the presence of EPEC, which should be further investigated to characterize the strains in terms of potential importance for consumer health.*

Keywords: *Chicken meat. Total coliforms. Escherichia coli. STEC. EPEC.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Consumo <i>per capita</i> de carne de aves no Brasil (em Kg) entre 2007 e 2016.....	14
Figura 2 – Tendência da produção brasileira de carne de frango entre 2006 e 2016.....	15
Figura 3 – Volume e receita de exportação de carne de frango brasileiro 2006-2016.....	15
Figura 4 – Distribuição da produção brasileira de carne de aves por estado em 2016.....	16
Figura 5 – Distribuição dos pontos de venda com coleta de amostras e número de <i>check outs</i>	34
Figura 6 – Obtenção da unidade analítica Hora Zero (H0) de rinsagem de carcaça aves amostradas no município de Xanxerê.....	36
Figura 7 – Pesquisa de genes de virulência <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i> no Caldo Hora 1 (Fase I)	39
Figura 8 – Pesquisa de genes de virulência <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i> no <i>pool</i> de DNA extraído de colônias típicas de <i>E.coli</i> isoladas de caldo H1 positivos na Fase I.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros de <i>E. coli</i> para avaliação de qualidade de processo aceitável, intermediário e inaceitável em amostra representativa de produtos preparados de carne de aves.....	30
Tabela 2 –	Distribuição dos pontos de venda com coleta de amostras e número de <i>check outs</i>	34
Tabela 3 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i> por PCR multiplex.....	42
Tabela 4 –	Distribuição das carcaças de aves amostradas de acordo com a localização do ponto de venda e número de <i>check outs</i>	43
Tabela 5 –	Número de carcaças amostradas por categoria de acordo com a disponibilidade nos pontos de vendas nos eventos de coleta.....	44
Tabela 6 –	Distribuição das treze marcas de carcaça de aves amostradas de acordo com os pontos de venda.....	45
Tabela 7 –	Distribuição de amostras de carcaça de aves provenientes de estabelecimentos de abate e processamento com Sistema de Inspeção Federal (SIF) ou Estadual (SIE) entre os pontos de venda.....	46
Tabela 8 –	Enumeração de coliformes totais (UFC.g ⁻¹) e <i>E. coli</i> (UFC.g ⁻¹) em carcaças de aves comercializada em Xanxerê.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	13
2.1	A importância da carne de aves	13
2.2	A microbiota da carcaça e o controle do processo de abate	16
2.3	<i>Escherichia coli</i>. (<i>E.coli</i>)	18
2.3.1	Morfologia e crescimento.....	19
2.3.2	Comportamento bioquímico.....	19
2.3.3	Estrutura antigênica e fatores de patogenicidade.....	20
2.4	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina shiga (STEC)	22
2.4.1	Fatores de patogenicidade de STEC.....	23
2.4.2	Ocorrência em animais.....	25
2.4.3	Ocorrência em alimentos envolvidos em surtos.....	27
2.4.4	Ocorrência em humanos.....	27
2.4.5	A doença em humanos.....	28
2.5	Enumeração de <i>E.coli</i> em carcaças de frango	29
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivo específico	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Delineamento do estudo	33
4.2	Processamento Laboratorial das amostras	35
4.3	Quantificação de <i>E. coli</i> e coliformes totais	36
4.3.1	Quantificação de coliformes totais e <i>E. coli</i> em Chromocult.....	36
4.3.2	Deteção de <i>E. coli</i> em BEM.....	36
4.3.3	Cálculo do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de coliformes totais e <i>E.coli</i> nas carcaças.....	37
4.4	Pesquisa de genes <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂ e <i>eae</i> no líquido de rinsagem das carcaças	37
4.5	Pesquisa de genes <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂ e <i>eae</i> em colônias típicas de <i>E. coli</i> - Hora zero	38
4.6	Extração de DNA total –Caldo Hora 1	40

4.7	Extração de DNA de colônia típica de <i>E.coli</i>	41
4.8	Pesquisa de genes <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ e <i>eae</i> por PCR Multiplex.....	41
4.9	Confirmação da identidade de colônias típicas de <i>E. coli</i>	42
4.10	Análise de dados.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Caracterização da amostra de carcaças de aves analisada.....	43
5.2	Enumeração de Coliformes Totais e <i>E. coli</i>	47
5.3	Pesquisa dos genes <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ e <i>eae</i> em caldo H1.....	48
5.4	Pesquisa dos genes <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ e <i>eae</i> em colônias típicas de <i>E. coli</i> originadas de carcaças positivas para <i>eae</i> em H1.....	48
6	DISCUSSÃO.....	50
7	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento da população mundial desencadeia um maior consumo de alimentos e, por consequência, a necessidade de produção em escala. Estados Unidos da América (EUA) é o maior produtor mundial de carne de aves, seguido do Brasil, Europa e China, que juntos respondem por 60% do volume de produção mundial (UNITED STATES OF AMERICA, 2016). O Brasil consolidou-se como o 2º maior produtor mundial de carne de frango e exporta para mais de 143 países o equivalente a 34% de sua produção nacional (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL, 2017).

Neste cenário de produção em alta escala e alto consumo, a inocuidade é uma prioridade global e imperativa para todos os países, por ser garantia de que o alimento não causará danos ao consumidor quando preparado e ou consumido de acordo com o uso pretendido (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2003), (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016). Após a “Operação Carne Fraca 2017”, a responsabilidade dos elos de produção da cadeia agroalimentar e da fiscalização pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento se aprimoraram. A revisão do Regulamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Decreto 9013 em 20 de março de 2017, atualizou o Sistema de Fiscalização Oficial de Carnes no Brasil como órgão fiscalizador e aumentou as responsabilidades da indústria em prover alimentos seguros para garantir a saúde e confiança do consumidor e o alcance dos requerimentos legais (BRASIL, 2017).

A produção de aves em escala industrial é sujeita à fatores de risco que influenciam a presença de micro-organismos patogênicos. Dentre esses, *Escherichia coli* produtora de shigatoxina (STEC) vem assumindo relevância. Nos Estados Unidos são estimados anualmente mais de 265.000 casos de doença transmitida por alimento causada por *Escherichia coli* produtora de shigatoxina, com apresentação de quadro diarreico brando até síndrome urêmica hemolítica (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018). Na Europa, a taxa de notificação de casos de STEC é de 1,27 por 100.000 habitantes (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016). Em 2015, a Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos-EFSA reportou a STEC como a 4º principal causa entre as 12 de maior ocorrência de hospitalização, com 5.901 casos de infecções, 853 hospitalizações e oito óbitos (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016). Identificaram, ainda, que STEC estava presente em 2,9% das amostras de alimentos e em 6,8% das amostras animais testadas. O sorogrupo O157 foi o mais prevalente nos humanos, alimentos e animais, seguido pelos sorogrupos O26, O103, O91, O145 e O146. Conforme relato na União Europeia, ao analisar

609 amostras de carne de frangos foi detectado a prevalência de 0,8% de *E.coli* STEC (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016). No Egito, Younis *et al.* (2017) ao analisar em 120 amostras de carne de frango, detectaram 6,5% de amostras positivas para STEC.

A transmissão de STEC na cadeia produtiva de frangos pode ocorrer pelo contato direto com fezes contaminadas das aves ou indireto através da água contaminada (STRACHAN *et al.*, 2006). A utilização de métodos moleculares para diagnóstico e estudos longitudinais tem propiciado importantes avanços na descoberta das inter-relações de patógenos na cadeia agroalimentar, seja animal, vegetal ou humana. Assim como vegetais podem ser contaminados por STEC pelo uso de fertilizante orgânico derivado de ruminantes que veiculam naturalmente STEC, não se pode subestimar o risco de aves também serem infectadas por este micro-organismo através da ração, contendo farinhas de ruminantes ou mesmo por contaminação cruzada em propriedades de criação de ruminantes. Falhas de biosegurança, higienização e vazios sanitários na criação podem favorecer a introdução e o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos nas aves. Ao abate, as carcaças comumente apresentam microbiota compatível com os micro-organismos existentes nas aves vivas que se dissemina durante as etapas de abate. A ruptura de papo e intestino, por falha de jejum pré abate ou por deficiência de evisceração, podem introduzir micro-organismos patogênicos na superfície das carcaças, comprometendo a qualidade higiênico-sanitária e a inocuidade da carne.

Assim, considerando o limitado conhecimento da ocorrência de STEC em aves no Brasil, este trabalho teve por objetivo investigar a ocorrência de carcaças de aves congeladas com presença de STEC destinadas para comercialização em supermercados do município de Xanxerê, Santa Catarina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

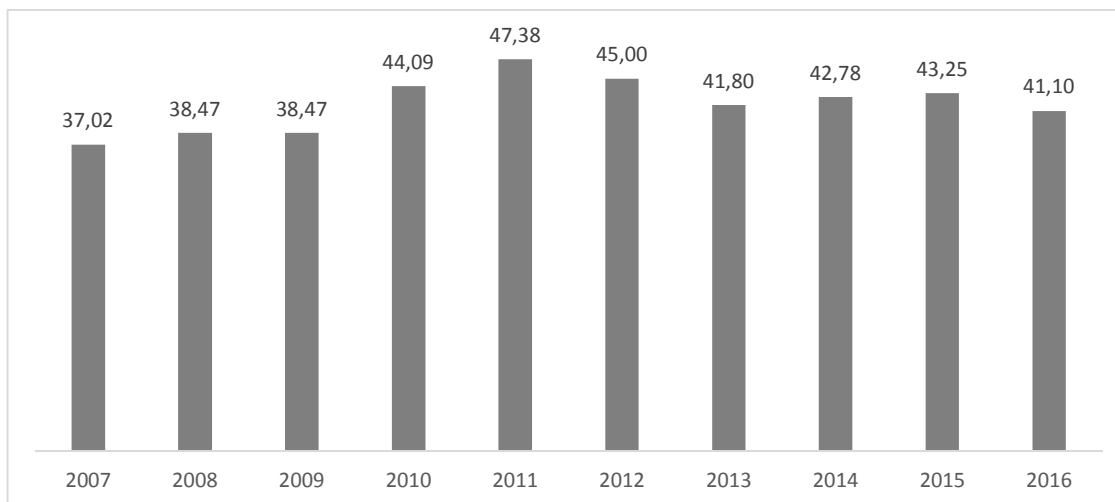
2.1 A importância da carne de aves

Nas últimas décadas, mudanças significativas ocorreram no hábito alimentar do consumidor, que tem passado a preferir alimentos mais saudáveis e menos processados, com maior teor de proteína e menos gordura e carboidratos. Por outro lado, o trabalho e o modo de vida induziram o consumidor à preferência por alimentos que ofereçam maior conveniência e praticidade a um preço justo. Entre todas as carnes do mercado, a carne de aves é a que mais se aproxima das expectativas do consumidor, estando cada vez mais presente nas refeições em razão de sua praticidade, custo, alta proteína, baixa gordura, boa digestibilidade e fonte de vitaminas do complexo B e minerais, como ferro e zinco (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2003).

O consumo mundial de carne de aves alcançou 12,2 kg per capita por ano de acordo com os dados da “Organization for Economic Co-Operation and Development” (OECD), despontando os Estados Unidos da América (EUA) como maior consumidor, com 49,8 kg por habitante por ano (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2017). A mesma tendência de aumento de consumo é observada na União Europeia, que além de grande produtor é também um importante importador de carne de aves. Igualmente encontra-se a Rússia e países do Golfo (Arábia Saudita, Kuwait, Emirados Árabes, Omman, Catar e Bahrain), com significativo consumo e marcante incentivo na produção de aves para autossuficiência.

O Brasil registrou de 2006 a 2016 um aumento de consumo de carne de aves de 11,02% (FIGURA 1). Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (2017), a carne de aves é a mais consumida, com 41,1 Kg per capita/ano, seguida da bovina e suína (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL, 2017).

Figura 1 – Consumo *per capita* de carne de aves no Brasil (em Kg) entre 2007 e 2016



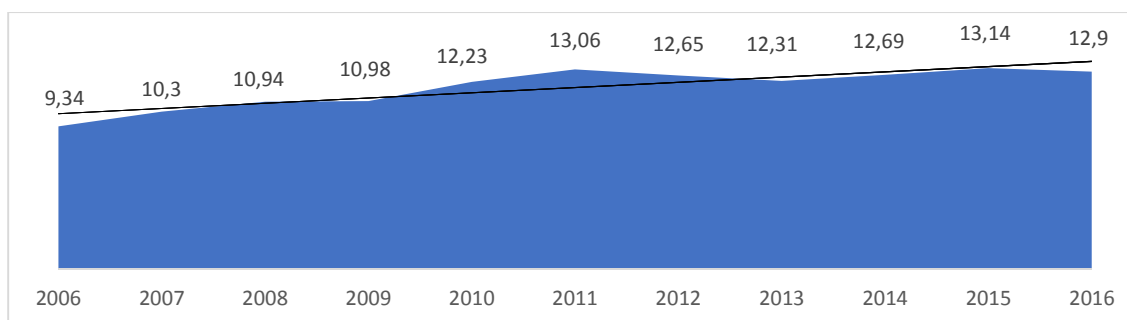
Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2017).

A carne de frango, resultado da transformação de proteína vegetal em animal, é reconhecida como uma importante matriz alimentar primária e como matéria prima para agregação de valor nutricional e sensorial em produtos industrializados. Diferentes modelos de criação de frangos, como sistema de alimentação exclusivamente com proteínas de origem vegetal, criação sem uso de promotores de crescimento, criação sem uso de antibióticos, criação sob princípios de bem-estar animal com ambiente enriquecido, entre outros, permitem o alcance de graduações superiores de qualidade das carnes de frangos.

No cenário mundial, a carne de frangos tem grande relevância na economia nacional e mundial. Os Estados Unidos, o Brasil e a China respondem juntos por 60% da produção mundial de carne de aves, com produções de 18.261, 12.900 e 12.300 milhões de toneladas, respectivamente (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL, 2017). Os Estados Unidos, apesar de ser o maior produtor, é o segundo maior exportador com 3,015 milhões de toneladas, devido ao alto consumo *per capita* interno de produtos in natura e transformados (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL, 2017).

O Brasil, caracteriza-se como o segundo maior produtor mundial de carne de aves e o primeiro maior exportador, tendo alcançado a produção de 12,900 milhões de toneladas em 2016 (FIGURA 2).

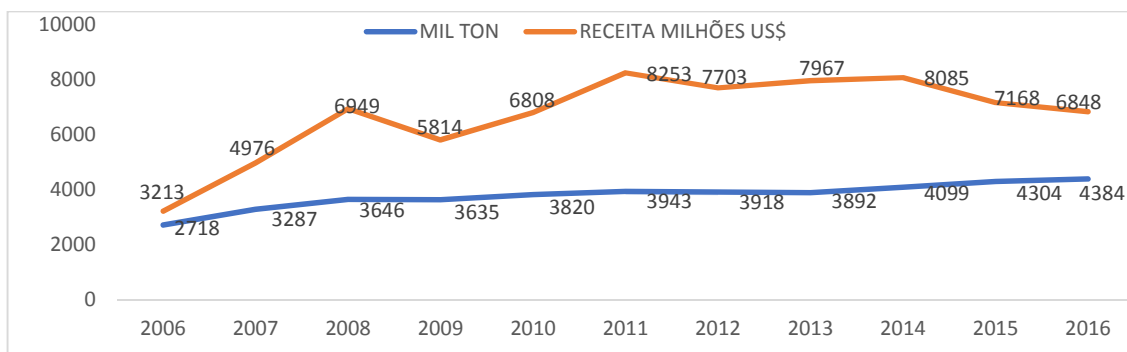
Figura 2 – Tendência da produção brasileira de carne de frango entre 2006 e 2016 em milhões ton



Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2017).

O Brasil, conquistou a posição de maior exportador mundial de carne de aves, alcançando em 2016 o recorde exportações de 4.384 mil toneladas, registrando aumento de 61,29% nos volumes exportados entre 2006 e 2016,(FIGURA 3).

Figura 3 – Volume e receita de exportação de carne de frango brasileiro 2006-2016

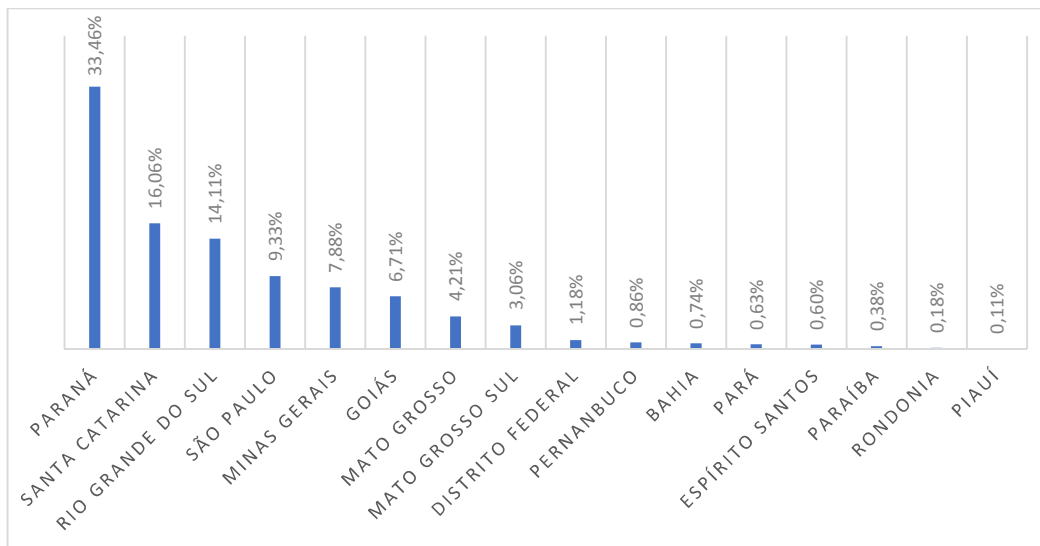


Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2017).

Esta plataforma brasileira de alimentação é relevante na economia e no abastecimento global, sendo este resultado reflexo do avanço tecnológico e investimentos contínuos em genética, nutrição, ambiência e para a segurança sanitária dos plantéis.

Do volume produzido pelo Brasil em 2016, 66% foi destinado ao consumo interno e transformação; o restante foi exportado, sendo os principais destinos: Arábia Saudita, China, Japão, Europa, África do Sul. Os produtos exportados foram: cortes de aves (59%), carcaças inteiras (31%), salgados (4%), industrializados (4%) e embutidos 2% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL, 2017). Do ponto de vista de regiões produtoras de carne de aves, segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, as maiores produções concentram-se nos estados do Sul (FIGURA 4).

Figura 4 – Distribuição da produção brasileira de carne de aves por estado em 2016



Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2017).

Santa Catarina é o segundo maior produtor nacional de carne de frangos e sua produção concentra-se no oeste catarinense, com importantes agroindústrias e cooperativas instaladas, as quais mantêm um sistema verticalizado e organizado de produção de aves.

2.2 A microbiota da carcaça e o controle do processo de abate

A microbiota das aves e seus derivados tem importantes implicações para a segurança alimentar e o tempo de prateleira do produto. As comunidades bacterianas presentes na carne de frango podem incluir espécies patogênicas (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016) e micro-organismos responsáveis pela deterioração, as quais podem levar a grandes perdas econômicas. Neste sentido, processadores e autoridades sanitárias usam para controle a microbiota da carcaça como indicador de avaliação da higiene de processo, das boas práticas de fabricação, das condições de estocagem (frio), validade de produto e potencial de risco à saúde pública (CHAI *et al.*, 2017).

Em termos de bactérias patogênicas, a carne de aves “in natura” pode apresentar: *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *Shigella* spp, *Streptococcus* spp, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, e *Bacillus cereus* (MORENO-GARCIA, 2006). Entre essas, *Escherichia coli*, tanto comensal como patogênica, podem ser parte da microbiota entérica das aves, uma vez que o contato direto com as fezes ocorre desde a ovo-

posição pela matriz pesada (galinha), no nascimento pelo mecônio e durante a criação dos frangos. A microbiota superficial, das vias respiratórias e do trato gastrointestinal das aves vivas é a principal fonte de contaminação de microrganismos para a carcaça e processos.

No processo de abate, algumas etapas contribuem para reduzir a contagem microbiana. Embora existam algumas diferenças entre as práticas nos abatedouros comerciais de grande escala e pequeno porte, os principais passos do abate de aves são semelhantes. Etapas específicas do abate são decisórias para reduzir *E. coli* da superfície de carcaça das aves como, a escaldagem, as toaletes de carcaças ao longo do abate, o controle da contaminação gastrointestinal e o pré-resfriamento. Outras etapas do abate comumente aumentam as contagens de *E. coli*, como a depenagem e evisceração, razão pela qual se faz necessário a adoção de medidas preventivas e higiênicas sanitárias nestas etapas de abate.

Na etapa de escaldagem, as carcaças são imersas em água, com binômios de “tempo e temperatura” ajustados de acordo com o comprimento do tanque e eficiência da soltura da pena. A água quente (50°C a 60°C) tem por função o afrouxamento do folículo da pena, no entanto, esta dilatação permite a entrada de bactérias das penas, da pele e das fezes, que conseguem proteção no folículo e resistir às temperaturas de escalda, mantendo-se viáveis. Na etapa subsequente, a depenagem, a pressão dos dedos de borracha sobre a pele, espalha as células bacterianas albergadas nos folículos, aumentando a contaminação cruzada superficial das carcaças e entre carcaças. As toaletes podem exercer uma ação de redução microbiana superficial, desde que atuem com apropriada pressão, número e bico em leque para cobrir ordenadamente toda a carcaça, começando a varredura mecânica dos resíduos e das células bacterianas de superfícies, no sentido das patas para o pescoço.

Na evisceração, a contaminação gastrointestinal deve ser evitada através de uma eficiente regulagem de máquinas e remoção de vísceras, de forma a evitar principalmente a ruptura de papo e intestino. Pulmão e vísceras não comestíveis são fontes de contaminação, devendo-se assegurar sua completa remoção da carcaça. O sistema mecânico de evisceração diminui o risco da contaminação por parte dos operadores e reduz o tempo de exposição de contato, porém pode ocasionar ruptura mecânica dos intestinos, resultando em importante contaminação por microrganismos entéricos (VON RUCKERT *et al.*, 2009). Neste sentido, o Programa de Análise de Perigos, considera como Ponto Crítico de Controle (PCC) a presença de resíduos gastrointestinais visíveis nas superfícies interna e externa das carcaças evisceradas, de maneira à garantir que carcaças contaminadas não entrem no sistema de resfriamento sem ter completado a remoção da contaminação visível. Northcutt (2003) observou a influência da idade, do tempo de retirada da ração antes do abate (0h e 12h) e do

efeito do uso de hipoclorito de sódio 200 ppm no chiller, na contagem de *E. coli* a partir de rinse. Também concluiu que a não retirada da ração das aves antes do abate pode aumentar a contagem de *E. coli* no resfriamento, embora possa não influenciar na contagem em carcaças pós chiller quando hipoclorito de sódio for usado na operação de resfriamento.

No resfriamento por imersão em água, a temperatura das carcaças alcança temperaturas inferiores a 16°C na saída do primeiro tanque de resfriamento e 4°C com tolerância de 7°C na saída do último tanque de resfriamento. O frio do resfriamento de carcaças, a constante renovação de água e o fluxo contra-corrente da água de imersão, contribuem para a remoção e redução da contaminação bacteriana da superfície das carcaças. Svobodová *et al.* (2012), ao avaliarem a contagem microbiana em diferentes etapas do processo de abate de frangos, observaram redução de 1 log UFC/g na contagem de mesófilos aeróbios e 2 log UFC/g na contagem de *E. coli* após as etapas de lavagem e resfriamento por imersão das carcaças.

Na carne fresca, as bactérias estão presentes na superfície e não no seu interior (LUBER, 2009), no entanto, durante o resfriamento por imersão, pode ocorrer introdução de microrganismos, presentes na água, para o interior do músculo, pela absorção da mesma.

Adicionalmente, a contaminação cruzada entre carcaças ou cortes pode ocorrer por contato direto ou por contato com superfícies contaminadas (VELUZ; PITCHIAH; ALVARADO, 2012), como equipamentos, esteiras, dedos de borracha de depenadeira, utensílios, manipulador, água e ar, sendo necessária a implantação de medidas de controle operacionais, que reduzam os riscos de introduzir microrganismos patogênicos para a carcaça. Segundo Álvarez-Astorga *et al.* (2002), as operações de transformação aumentam a área da superfície da carne em contato com superfícies de trabalho e ar e, conseqüentemente, a quantidade de bactérias é maior em produtos transformados do que em cortes primários.

Por fim, de acordo com Hinton Jr, Cason e Ingram (2004), o nível de contaminação das carcaças durante todo o processo de abate diminui após evisceração e resfriamento por imersão em água fria e aumenta, novamente, durante o armazenamento à temperatura refrigerada, razão pela qual o resfriamento também é um PCC, que tem o limite crítico de 4°C no interior do músculo em até quatro horas após a sangria da ave.

2.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertence à família Enterobacteriaceae e está vastamente distribuída na água superficial, plantas, solo e trato intestinal de humanos e animais (GUIMARÃES *et al.*,

2015). O termo *Escherichia* origina-se do sobrenome de Theodor von Escherichia que em 1885 isolou e descreveu a bactéria. Na ocasião, foi denominada de *Bacterium coli commune* e somente em 1958 recebeu a atual nomenclatura, em sua homenagem (BERCHIERI JUNIOR; MACARI, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2.3.1 Morfologia e crescimento

Escherichia coli apresenta-se em forma de bacilos medindo aproximadamente de 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm, com arranjos dos bastonetes aos pares ou isolados, móveis por flagelos peritríqueos, apresentam fimbrias e cápsulas ou microcápsulas (FRATAMICO; SMITH; BUCHANAN, 2002; MANNING, 2010).

Apresenta temperatura ótima de crescimento próxima à temperatura do organismo humano, 37°C, o que favorece sua colonização e infecção. As cepas de *E. coli* crescem em meios comuns, ágar ou caldo simples. Em ágar MacConkey, seletivo para bactérias Gram negativas, as colônias de *E. coli* apresentam coloração rosada característica devido à fermentação de lactose contida nesse meio, enquanto que algumas linhagens produzem colônias com brilho metálico em ágar-eosina-azul de metileno (EMB). As colônias em ágar Nutriente possuem coloração esbranquiçada, com tamanho que varia de um a três milímetros, podendo ser lisas ou rugosas e normalmente brilhantes e no ágar sangue apresentam-se como colônias acinzentadas com atividade alfa-hemolítica, (TRABULSI; ALTERTHUM; SADDY, 2008).

2.3.2 Comportamento bioquímico

Escherichia coli tem capacidade de reduzir o nitrato à nitrito, é oxidase negativa, fermenta a glicose e produz a enzima catalase. É capaz de fermentar, com produção de gás e ácido, diversos carboidratos como glicose, lactose, maltose, galactose e manose. Não obstante, é negativa para as provas de Voges Proskauer (VP), hidrólise da ureia, liquefação de gelatina, e positivas para provas da descarboxilação da lisina, produção de indol e motilidade em meio semisólido (MURRAY *et al.*, 1999; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Nos testes IMViC, apresenta-se com reação positiva para as provas de produção de indol e vermelho de metila e negativa nos testes de VP-Voges Proskauer e utilização de citrato. Algumas cepas podem produzir H₂S. Também apresentam atividade das enzimas β-galactosidase e β-

glucoronidase (QUINN *et al.*, 2005; BERCHIERI JUNIOR; MACARI, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

2.3.3 Estrutura antigênica e fatores de patogenicidade

A estrutura antigênica define o sorogrupo de *E. coli* com base nos antígenos somáticos “O”, capsulares “K”, flagelares “H” e fimbriais “F”. A patogenia é variável de acordo com os fatores de virulência, na dependência do sorotipo e dos ganhos genéticos ocorridos durante o processo evolutivo da espécie, com a aquisição de genes de virulência, por meio de mutações ou transferência horizontal de material genético. Os genes de virulência, contidos em ilhas de patogenicidade, no cromossomo bacteriano ou em material genético extra-cromossômico (plasmídios), codificam proteínas que possibilitam a colonização, penetração e invasão de novos sítios em seus hospedeiros (HENTSCHEL; HACKER, 2001; SAVIOLLI, 2010).

O antígeno somático “O” é parte do lipopolissacarídeo (LPS) que compõe a membrana externa da parede bacteriana. É constituído pelo polissacarídeo C, que juntamente com o lipídeo A e a porção de ancoramento constituem o LPS completo. O polissacarídeo C é composto por uma cadeia de açúcares que se projeta para o espaço extracelular, apresentando composição extremamente variável mesmo dentro de uma mesma espécie bacteriana. A identificação do antígeno somático é realizada por meio de provas de aglutinação com antissoros padrões que determinam os diferentes sorogrupos em uma mesma espécie, (BARCELOS, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2007). O lipídeo A é uma endotoxina que atua na ativação de macrófagos e liberação de mediadores da inflamação (citocinas e TNF), causando choque séptico. É altamente conservado sendo liberado durante a fase de multiplicação ou após a morte bacteriana (BARCELOS, 2005).

O antígeno capsular “K” é relacionado à resistência aos efeitos bactericidas do sistema complemento, devido à presença do ácido N-acetil neuramínico da cápsula. É composto por um ácido polimérico contendo 2% de açúcares reduzidos. A cápsula é um dos componentes bacterianos de menor imunogenicidade. Quando aquecida a 100°C, por aproximadamente uma hora, pode ser removida, contudo algumas amostras necessitam de aquecimento a 121°C por duas horas e meia. Com base no perfil de termo estabilidade, o antígeno K pode ser subdividido em L, A e B. A identificação deste antígeno geralmente é feita através de testes de aglutinação (BERCHIERI JUNIOR; MACARI, 2009).

O antígeno flagelar “H”, de natureza proteica, quando aquecido a 100°C pode ser destruído e sua identificação é realizada através de testes de aglutinação em tubo após a

incubação a 37°C por duas horas. (BARCELOS, 2005; BERCHIERI JUNIOR; MACARI, 2009).

O antígeno fimbrial “F”, chamado também de adesinas, pili ou fímbrias são moléculas de natureza proteica que recobrem a superfície bacteriana, capazes de reconhecer receptores específicos na superfície de células eucarióticas (BARCELOS, 2005). Este fator de virulência é imprescindível no processo de aderência e colonização dos tecidos do hospedeiro. As adesinas podem conferir especificidade da aderência da bactéria em relação a determinados tecidos e hospedeiro. Mesmo apresentando poucas diferenças morfológicas entre as adesinas, elas possuem propriedades antigênicas e hemaglutinantes distintas. A utilização do carboidrato D+manose permite classificar as fímbrias em dois grandes grupos: manose sensíveis, quando a hemaglutinação é inibida pela presença do carboidrato, e manose resistentes, quando a hemaglutinação ocorre na presença da manose (BERCHIERI JUNIOR; MACARI, 2009). Estas fímbrias são responsáveis pela ligação da bactéria à matriz extracelular, favorecendo a sobrevivência das bactérias em ambientes externos aos hospedeiros, assim como em sua patogenicidade contribuindo para colonização inicial (CAMPOS, 2006).

Outros fatores de patogenicidade de *E. coli* podem estar presentes em cepas capazes de sintetizar substâncias como colicinas, sideróforos, enterotoxinas e citotoxinas. As colicinas são substâncias que inibem o crescimento de diversas espécies bacterianas no nicho onde estão presentes. Adicionalmente, algumas cepas de *E. coli* podem também sintetizar diversos compostos capazes de capturar ferro no organismo, como sideróforos que competem com as transferinas do hospedeiro pelo ferro, podendo, assim, multiplicar-se nos fluidos orgânicos (ASSIS; SANTOS, 2001; CAMPOS, 2006).

A capacidade de *E. coli* em resistir aos efeitos bactericidas do sistema complemento no soro do hospedeiro, é mediada por estruturas da superfície bacteriana como cápsula, lipopolissacarídeo, e proteínas da membrana externa (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Alguns polissacarídeos da cápsula são capazes de interagir com moléculas C3 e C3b nas rotas clássica e alternativa do complemento. O antígeno K1 presente na cápsula previne a ação da rota alternativa do sistema complemento nesses patótipos. Cepas de *E. coli* patogênica para aves, APEC, que expressam antígeno K1 são mais resistentes aos efeitos bactericidas do soro do que as que expressam outro tipo de antígeno K (REIS, 2011).

Virulência pode ser definida como a capacidade do micro-organismo desenvolver doença em um hospedeiro (JOHNSON, 1991). A virulência está diretamente correlacionada

ao efeito cumulativo dos fatores de patogenicidade, podendo ser multifatorial (JOHNSON, 1991; MELO, 2006).

Uma considerável parcela das cepas de *E. coli* vivem em comensalismo no trato intestinal do hospedeiro, todavia, a sua evolução viabilizou a gênese de clones carreadores de elementos gênicos móveis, como plasmídios e *transposons*, culminando em cepas altamente adaptadas, com distintas combinações gênicas (FAGUNDES, 2013).

É notável a importância da transferência de genes de patogenicidade entre cepas, propiciando o aparecimento de patotipos de *E. coli*, capazes de causar diferentes tipos de infecção e sintomas clínicos nos acometidos (BOYD; HARTL, 1998; LLOYD *et al.*, 2009). Do ponto de vista da patogenicidade, as cepas de *E. coli* são classificadas fundamentalmente em dois grandes grupos: as linhagens associadas às infecções extra intestinais (ExPEC), cujas cepas se disseminam em diversos tecidos, como a corrente sanguínea, sistema nervoso e trato urinário, onde causam infecção com distintos níveis de gravidade e as linhagens relacionadas às manifestações clínicas entéricas ou diarreicogênicas (DEC) (OLIVEIRA, 2011; CORRÊA, 2012).

No trato gastrointestinal, as *E. coli* extra intestinais (ExPEC) são constituintes da microbiota normal, ou seja, colonizam o intestino sem causar infecção (RUSSO; JOHNSON, 2000; CORRÊA, 2012). No entanto, as ExPECs são aptas a se disseminar e colonizar outros nichos no hospedeiro (WILES KULESUS; MULVEY, 2008). A classe de ExPEC é constituída por *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC), *E. coli* patogênica aviária (APEC).

As DEC, por sua vez, são subdivididas em sete grupos, sendo elas: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) podendo ser Enterohemorrágica EHEC/VTEC; *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). *E. coli* patogênica para coelhos (REDEC) e *E. coli* produtora de aderência difusa (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998; VIDAL *et al.*, 2005; VERONESI; FOCACCIA 2005; MARTINEZ; TADDEI, 2015).

As infecções desencadeadas por patotipos de *E. coli* diarreicogênicas promovem gastroenterites, mas raramente manifestações clínicas fora do ambiente gastrointestinal.

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

É responsável por causar diarreia e colites hemorrágicas em humanos, sendo considerada um importante grupo de bactérias patogênicas emergentes. As STEC tornaram-se

um grande desafio à saúde pública, por estarem envolvidas em surtos de doenças transmitidas por alimentos e possuírem um alto grau de infectividade para os seres humanos, pois mesmo em baixo número de células no alimento ingerido, (10 células), são capazes de provocar infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). As STEC são classificadas em sorogrupos, de acordo com o antígeno somático “O”. Dentre as STEC, o sorogrupo O157 tem sido o principal, devido ao seu envolvimento em surtos de doença transmitida por alimentos; entretanto, há mais de 50 outros sorogrupos que podem causar doença (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018). Muitos casos vêm ocorrendo em todo o mundo devido a cepas patogênicas de STEC não-O157, como O26, O103, O111 e O145 (ALVARES, 2011).

As STEC são encontradas em várias espécies de animais domésticos e selvagens, possíveis portadores assintomáticos; no entanto, os ruminantes, e em especial os bovinos, são considerados os principais reservatórios de STEC, incluindo o sorotipo mais importante do grupo, o O157:H7. A bactéria pode ser excretada nas fezes que, por sua vez, tendem a contaminar águas de superfícies ou subterrâneas, bem como culturas de hortifrutigranjeiros, o solo e produtos de origem animal, como os produtos lácteos à exemplo de queijo e leite cru. Além disso, *E. coli* O157:H7 também pode ser transmitida pelo contato direto com animais infectados, por meio da transmissão fecal-oral e contaminação cruzada no preparo de alimentos. (CALDORIN *et al.*, 2013). Geralmente a infecção ocorre após a ingestão de alimentos ou água contaminados (GOBERT *et al.*, 2008; VISCARDI *et al.*, 2008; BONO *et al.*, 2007; VISCARDI *et al.*, 2008). A dose infectiva de *E. coli* O157:H7 é baixa, sendo que de uma a dez células já é capaz de causar enfermidade em humanos (SCHMID-HEMPEL; FRANK, 2007). *E. coli* O157:H7 é citada como causa de 1% dos casos de doenças transmitidas por alimentos na Inglaterra e no País de Gales e 3% na Escócia (MONEY *et al.*, 2010). A infecção depende de fatores de virulência da cepa e de características do hospedeiro (KAWANO *et al.*, 2008). No início do processo, as STEC necessitam vencer os mecanismos de defesa do organismo hospedeiro e se estabelecer no intestino. Nesse sentido, é interessante o fato de STEC apresentar resistência a ambientes ácidos, uma vez que tais microrganismos conseguem atravessar o estômago e sobreviver à sua acidez (MATHUSA *et al.*, 2010; LUCATELLI, 2012).

2.4.1 Fatores de patogenicidade de STEC

A STEC caracteriza-se pela produção de toxinas do tipo Shiga, também denominadas de verotoxinas, pois são citotóxicas para células Vero originárias de rim de macaco verde africano. Podem ainda ser denominadas de toxinas *Shiga-like* pela similaridade com a toxina produzida pelo bacilo *Shigella dysenteriae* tipo 1, causador da disenteria bacilar (MENG *et al.*, 2007). Essas citotoxinas são potentes inibidoras da síntese proteica e são codificadas pelos genes – *stx1* e *stx2*. Os genes *stx*, que codificam a toxina, estão localizados no genoma de um bacteriófago que se integra ao cromossomo das STEC. A presença desses genes em bacteriófagos propicia não somente a capacidade de disseminação entre diferentes cepas, como também a presença das duas toxinas em uma mesma bactéria. Portanto, STEC pode apresentar um ou mais genes *stx* simultaneamente. (CALDORIN *et al.*, 2013).

Quando a STEC se adere na célula intestinal, as toxinas Stx1 e Stx2 são produzidas no intestino grosso e translocadas pelo epitélio intestinal para a circulação sanguínea. Essa toxina, quando se liga ao seu receptor, é endocitada e transportada para o complexo de Golgi e, posteriormente, para o retículo endoplasmático, bloqueando a síntese proteica, o que resulta em perda de integridade e lesão das células endoteliais vasculares pela necrose ou apoptose, cujo efeito pode ser local ou sistêmico. Essas toxinas, em contato com os rins via corrente sanguínea, causam danos ao endotélio vascular e oclusão de micro vasos, por meio de uma combinação de toxicidade direta e indução da inflamação local, os quais podem levar à Síndrome Hemolítica Urêmica.

Além da produção de toxinas Stx, a patogenicidade de STEC está relacionada com a adesão da bactéria à superfície do enterócito e à produção de hemolisina. A adesão está associada à expressão do gene *eae*, que induz a lesão denominada *attaching and effacing* (A/E), que é caracterizada pela lesão das microvilosidades intestinais em decorrência da íntima fixação da bactéria à membrana epitelial do hospedeiro através de “pedestais” de agrupamentos proteicos densos (actina polarizada) e outros elementos do citoesqueleto (DONNENBERG *et al.*, 1993; FRANKEL *et al.*, 2001). Esse gene está localizado no cromossomo, em uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE). (CALDORIN *et al.*, 2013; PATON; PATON, 1998; FRANKEL *et al.*, 2001).

As lesões A/E são mediadas pela intimina, uma adesina de 94 kDa, codificada pelo gene *eae*, responsável pela firme aderência entre a bactéria e a membrana dos enterócitos (DONNENBERG *et al.*, 1993). Além da intimina, a ilha de patogenicidade LEE também codifica um complexo de proteínas translocadoras (EspA, EspB e EspD) e efetoras (EspF, EspG, EspH, EspZ e Map), assim como Tir, o receptor de intimina que é translocado pela

bactéria na célula do hospedeiro. Estas proteínas e o receptor Tir fazem parte de sistema de secreção tipo III (FRANKEL *et al.*, 2001; CORNICK; BOOHER; MOON, 2002).

Após o íntimo contato entre as STEC e as células intestinais, as toxinas Stx1 e Stx2 são translocadas para o interior do enterócito. São compostas de uma subunidade A e cinco subunidades B. A subunidade A é dividida nos fragmentos A1 – fração enzimática da toxina - e A2. O fragmento A2 é responsável pela ligação da subunidade A ao pentâmero de subunidades B. O pentâmero B liga a toxina a um receptor globotriaosilceramida (Gb3), presente na membrana de células eucarióticas. Gb3 é o principal receptor para Stx, mas a variante Stx2 utiliza o receptor Gb4. Após a ligação ao receptor, a toxina é endocitada e transportada para o complexo de Golgi e posteriormente para o retículo endoplasmático. Nesse momento, a subunidade A é translocada para o citoplasma e atua sobre a fração 60S dos ribossomos dos enterócitos. Especificamente, a subunidade A1 é uma N-glicosidase que remove um resíduo de adenina da fração 28S do RNA ribossômico, bloqueando dessa forma a síntese proteica. A inibição da síntese proteica leva à necrose ou apoptose das células (NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A infecção por STEC é localizada e não causa septicemia; entretanto, as toxinas Stx pode ser absorvida pelas células intestinais e causar os efeitos sistêmicos da doença (GYLES, 2006).

A produção de entero-hemolisina (Ehx), uma hemolisina da família de toxinas citolíticas, é codificada pelo gene *ehx* localizado em um plasmídeo de 60 MDa (pO157) (SAITOH *et al.*, 2008), presente tanto em amostras O157 como em cepas do sorotipo O26:H11 e na maioria de STEC isoladas de humanos. Acredita-se que a contribuição da entero-hemolisina na patogênese das doenças causadas por STEC seja semelhante à de outras hemolisinas, ou seja, o acesso ao elemento químico ferro, originário da lise dos eritrócitos, necessário ao metabolismo bacteriano e ao estímulo do crescimento de STEC (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

2.4.2 Ocorrência em animais

Estirpes de *E. coli* estão presentes em grande número na microbiota intestinal dos animais, sendo que os animais carreadores de genes relacionados a STEC podem ser reservatório naturais da bactéria, cujo potencial zoonótico pode representar risco à saúde pública. A ocorrência de STEC é relatada em bovinos, ovinos, caprinos, suínos, felino, cães, equídeos, pássaros, animais silvestres, fragatas, peixes e cervos (GRIFFIN; TAUXE, 1991;

BEUTIN *et al.*,1993; FAIRBROTHER; GYLES, 2006; DE PÁULA; MARIN,2008; SAVIOLLI, 2010; CARDOZO,2014). No Brasil o estudo de 18 relatos de isolamento de STEC no período de 1999 a 2012, reporta que a ocorrência de STEC em bovinos variou de 1,4 a 71%, em ovinos de 56 a 68%, enquanto em cães foi de 0-13% (CALDORIN *et al.*, 2013).

Em bovinos, a prevalência é maior em animais jovens e em períodos quentes e o agente pode permanecer viável nas fezes bovinas, no pasto e na água, por até dois anos (CALDORIN *et al.*, 2013). Sandrini *et al.* (2007), ao estudarem a presença de STEC em fezes bovinas de 60 propriedades na bacia leiteira de Pelotas, observaram prevalência menor em propriedades que realizavam algum tipo de tratamento de água. A dieta alimentar está, também, relacionada à excreção de STEC, principalmente em rebanhos confinados. Normalmente, a acidez estomacal é uma barreira efetiva à infecção dos patógenos alimentares, porém, a adaptação que a STEC sofreu no rúmen do bovino a torna capaz de sobreviver a este mecanismo de defesa. A diferença de patogenicidade de STEC entre as espécies hospedeiras, sugere que bovinos possam ser insensíveis à ação da toxina Shiga ou que estas toxinas tenham atividade diferenciada entre os hospedeiros (CALDORIN *et al.*, 2013).

Em aves, BEUTIN *et al.* (1993) descreve indícios de que estas podem servir de reservatório para STEC, já que este patógeno é capaz de colonizar o ceco de galinhas, sendo eliminado pelas fezes. As aves podem excretar STEC por vários meses, mesmo que a frequência de STEC em fezes, carcaças e carne de aves seja extremamente baixa (BEERY; DOYLE; SCHOENI, 1985). Na Eslováquia, Pilipčinec *et al.* (1999), reportaram a presença de *E. coli* O157 em 20 dos 216 “swabs” da cloaca de aves colhidos em abatedouros. Na Argentina, Chinen *et al.* (2009) detectaram STEC O157 em 6,8% das amostras de hambúrgueres bovinos e de frangos e 10,3% em carcaças de aves.

Younis *et al.* (2017) descreveram a prevalência de *E. coli* em carne de aves congeladas, sendo 14 das 120 amostras (11,66%) positivas para *E. coli*, predominando os sorotipos O78, O128:H2; O121:H7 e O44:H18. Das 120 amostras avaliadas, oito cepas de *E. coli* (6,6%) foram identificadas como sendo produtora de Shiga toxina, sendo duas positivas para o gene *stx1*, três para *stx2* e três cepas apresentaram ambos os genes. Somente uma cepa do sorotipo O26 apresentava todos os genes de virulência (*stx1*, *stx2* e *aea*).

No Brasil, Silva *et al.* (2011) identificaram 13,3% de positividade de STEC em fígado de aves em dois abatedouros e recomendaram a utilização de tecnologias para identificação e prevenção de *E. coli* nos aviários e nos abatedouros avícolas. Ainda no Brasil,

Costa (2010) e Alvares (2011) não encontraram presença de STEC ao analisarem 138 amostras de coxa de frango e 100 cortes de aves, respectivamente, no comércio de São Paulo.

2.4.3 Ocorrência em alimentos envolvidos em surtos

Os principais alimentos envolvidos na transmissão deste patógeno são carnes mal cozidas, leite não pasteurizado e seus derivados e vegetais contaminados (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; AUVRAY *et al.*, 2008). Alimentos de origem animal e vegetal têm veiculado STEC e causado diversos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, sendo a causa predominante do maior número de hospitalizações e morte nos EUA (SCALLAN *et al.*, 2011). Segundo Paton e Paton (1998) e Potter *et al.* (2004), o consumo de carne contaminadas por STEC pode determinar desde uma leve diarreia não sanguinolenta até colites hemorrágicas (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombótica trombocitopênica (PTT).

Nos Estados Unidos, o primeiro surto reportado, relatado em 1982, foi causado pela STEC O157:H7, levando a quadro de colite hemorrágica em indivíduos que haviam ingerido hambúrguer mal cozido em uma rede de *fast-food*. Este sorotipo foi denominado de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e, posteriormente classificada como STEC (RILEY *et al.*, 1983). Desde então, a STEC vem sendo apontada como causa de surtos no Canadá, Japão, Reino Unido e Estados Unidos (CALDORIN *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos, a maioria dos surtos por STEC têm sido relacionados a cepas de STEC O157:H7 (RANGEL *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2011). Entretanto, Law (2000) cita que outros sorovares produtores de toxina shiga podem igualmente causar surtos. Feng *et al.* (2011), reporta a ocorrência de surtos envolvendo alimentos não cárneos, como alface e espinafre. Essas observações corroboram os estudos dos pesquisadores europeus, como Gerber *et al.* (2002), Tozzi *et al.* (2003) e Blanco *et al.* (2003), que constataram o aumento do envolvimento das cepas de STEC não-O157 em casos de diarreia sanguinolenta e SHU na Alemanha, Áustria, Espanha e Itália. Entretanto, *E. coli* O157 continua sendo o principal sorotipo de STEC do ponto de vista de saúde pública e como causadora de SHU (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018).

Em relação a alimentos incluindo carne de frango, Whittaker *et al.* (2009) relataram o envolvimento de carne de frango em doze casos associados ao consumo de “wrap” de frango, limão e coentro originários de uma única cadeia de supermercados na Europa.

2.4.4 Ocorrência em humanos

O principal sorovar de STEC envolvido em infecções humanas, causando colite hemorrágica e HUS tem sido O157:H7 (FENG *et al.*, 2011). Entretanto, sintomas relacionados à ação de toxina de shiga em outros sorovares de *E. coli* não O157:H7 têm sido reportados e, segundo Kaper, Nataro e Mobley (2004), poderia ser consequência de ganhos de material genético presentes em elementos móveis, como plasmídeos e bacteriófagos. Neste sentido, diversas pesquisas apontam o aumento de participações de shiga toxinas em casos de surtos oriundos de microrganismos não-O157. Fremaux *et al.* (2007), citam, por exemplo, os sorovares O26, O103 e O111 como comumente associados a doenças humanas.

Na América do Sul, Uruguai, Chile e, especialmente Argentina, apresentam incidências relativamente altas de infecções humanas por STEC e de casos de síndrome hemolítica urêmica, quando comparada aos países do hemisfério norte, fato este atribuído aos hábitos alimentares e à alta prevalência de STEC em bovinos e suas carnes (CALDORIN *et al.*, 2013). Na Argentina, são notificados cerca de 400 novos casos de SHU anualmente em unidades de nefrologia de hospitais (SIGNORINI; TARABLA, 2010). Ainda neste país, 95% dos casos de SHU acometem crianças menores de cinco anos de idade, com incidência em 2002 de 12,2 casos a cada 100.000 habitantes (SIGNORINI; TARABLA, 2010).

No Brasil, os relatos entre 1976 a 1999 apresentam ocorrências em humanos variando 0,59 a 6,25% (CALDORIN *et al.*, 2013). Mais tarde, cepas de O157:H7 foram isoladas de fezes de pacientes no Estado de São Paulo, pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL). Irino *et al.* (2002) reportou três isolamentos de *E. coli* O157:H7 produtora de shigatoxina no estado de São Paulo entre 1990 e 2001. A primeira cepa foi isolada em 1990, de um paciente com 18 anos de idade, com diarreia, e que era positivo para HIV. As outras duas cepas foram isoladas de criança com quatro anos de idade com diarreia sanguinolenta e de um adulto, com diarreia severa, ambos hospitalizados no município de Campinas, São Paulo, em 2001 (IRINO *et al.*, 2002).

Os humanos são mais comumente expostos a amostras de STEC não O157, pois estas são encontradas com maior frequência em animais, e como fonte de contaminação de alimentos e água (BLANCO *et al.*, 2003). No Brasil, Guth *et al.* (2002) relataram o primeiro isolamento do sorotipo O26:H11 em criança de 8 meses de idade, que apresentava anemia, oligúria, edema nas extremidades inferiores, diarreia aguda, trombocitopenia e insuficiência renal, levando a um diagnóstico de SHU. A cepa expressava os genes *stx1*, *ehx* e *eae*.

2.4.5 A doença em humanos

O período de incubação da enfermidade provocada por STEC é de três a quatro dias e a duração média dos sintomas de oito dias. O início da enfermidade é caracterizado por intensas cólicas abdominais, diarreia abundante e febre de curta duração, podendo ocorrer vômitos. Após dois dias, as fezes apresentam-se sanguinolentas, com presença de coágulos e intensificação de dor abdominal. Este estágio costuma durar em torno de quatro a dez dias e, na maioria dos pacientes não há sequelas, porém em aproximadamente 10% dos casos a doença progride para SHU e complicações subsequentes. Os sorotipos mais virulentos estão associados a enfermidades severas que consistem em uma microangiopatia trombótica. Sua severidade varia de doença moderada, caracterizada por anemia hemolítica e trombocitopenia até insuficiência renal, podendo levar à morte. A SHU é mais frequentemente associada a crianças menores de cinco anos de idade (CALDORIN *et al.*, 2013). Estima-se que de 3 a 5% das crianças afetadas vão a óbito e de 12 a 30% apresentam sequelas como falência renal, hipertensão ou sintomas relacionados com o sistema nervoso central (NATARO; KAPER, 1998).

O tratamento adequado compreende a reposição de água e sais minerais para restabelecer o equilíbrio eletrolítico e limitar a severidade e ou duração dos sintomas gastrointestinais e evitar complicações como a SHU, que inclui medidas de manutenção da homeostase do organismo, como diálise e controle de hipertensão (PATON; PATON, 1998). A toxina Shiga apresenta ação extracelular, grande parte dela permanecendo aderida à superfície da célula bacteriana. Dessa forma, não é recomendado o uso de antibióticos, uma vez que eles causam lise da célula bacteriana e podem aumentar as toxinas liberadas no lúmen intestinal, agravando o quadro clínico do paciente (PATON; PATON, 1998).

2.5 Enumeração de *Escherichia coli* em carcaças de frango

E. coli é um indicador de eleição para a avaliação higiênico-sanitária do produto e do processo, dada sua vasta distribuição, fácil cultivo e diferenciação. No que se refere a distribuição, é o tipo de bactéria que pode viver em muitos ambientes diferentes, como intestino, solo, na água, nas plantas, nas pessoas e animais. É utilizado como um indicador de contaminação fecal, direta ou indireta de águas e alimentos (MANNING, 2010).

Em estudo na Bélgica, Ghafir *et al.* (2008), correlacionaram os indicadores de higiene com os agentes zoonóticos e concluíram que *E. coli* pode ser considerado o melhor indicador. Assim, a enumeração de *E. coli* tem duas importantes aplicações: uma como indicador de higiene de processo que permite estimar o nível de higiene a que a carne esteve submetida

quando de sua produção, processamento ou manipulação e outra como critério microbiológico com quantificação do número de células de uma cepa patogênica com objetivo de estimar o risco do perigo e o seu controle.

Na indústria avícola, a aplicação de *E. coli*, como indicador de higiene, pode ter aplicação tanto qualitativa, como quantitativa de um produto nas diferentes etapas de elaboração. Svobodová *et al.*(2012), na República Tcheca quantificaram *E. coli* em carcaças de frangos em várias etapas do abate e concluíram que a contaminação por *E. coli* diminui com cada etapa do processamento, demonstrando que o processo está sob controle.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu o regulamento técnico de padrões para alimentos destinados aos consumo humano, através da Resolução N° 12 de 02 de janeiro de 2001, tendo definido para carne de aves o requerimento quantitativo de coliforme a 45°C/g, como indicador de higiene. Considerando que a presente pesquisa concentrou-se na avaliação de *E.coli*, como indicador de higiene e como patógeno, não há isonomia entre os indicadores para fins de avaliação do atendimento legal das amostras deste estudo.

Na União Europeia, no entanto, o Regulamento (CE) n° 2073/2005 relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis a alimentos, prevê o monitoramento quantitativo de *E. coli* e estabelece níveis de aceitabilidade, como descrito na Tabela 1 (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2005).

Tabela 1 – Parâmetros de *E. coli* para avaliação de qualidade de processo aceitável, intermediário e inaceitável em amostra representativa de produtos preparados de carne de aves

Qualidade Sanitária	Limites
Aceitável	5 amostras < 5 x10 ² UFC/g
Intermediária	3 amostras < 5x 10 ² UFC e 2 amostras entre 5x10 ² e 5 x10 ³ UFC/g
Inaceitável	Mais de 3 amostras > 5x10 ² UFC/g e 2 amostras > 5x10 ³ UFC/g.

Fonte: CEE (2013).

Colmegna *et al.* (2009) examinaram amostras de frango (ave inteira, coxa, sobrecoxa, peito, filé, asa, assados, peru e faisão, na Itália, e verificaram que 90% dos resultados obtidos

na análise de *E. coli* foram menores que 30 UFC/g de amostra e os 10% restantes mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pelo Regulamento CE nº 2073/2005 com respeito a produtos preparados à base de carne.

A enumeração de *E. coli* também tem aplicação na gestão da qualidade, como norteador de validação e melhoria dos critérios de desempenhos de abate. Altekruze *et al.* (2009) avaliaram 20 das 127 grandes operações de abates de aves dos Estados Unidos, amostrando um total de 800 carcaças pelo método de rinse. A contagem média antes do chiller foi de 3,3 log UFC/mL ($\pm 0,6$) e após o chiller 0,8 CFU/mL. Observaram também que os abatedouros com contagens *E. coli* menores ou iguais a 1,1 UFC/mL tinha a menor prevalência de *Salmonella sp* e *Campylobacter sp* em relação ao conjunto de abatedouros de médias maiores.

No Canadá, Powell *et al.* (1995) avaliaram a contagem de *E. coli* em carcaças inspecionadas com contaminação visível após evisceração e carcaças após reprocessamento, fora da linha, seguida de lavagem por spray interno e externo de 5 segundos, aplicação de vácuo e outra lavagem de spray interno e externo de 15 segundos. Os autores relataram médias de contagem de *E. coli* em carcaças inspecionadas de 3,34 log UFC/mL, enquanto as reprocessadas apresentaram 2,96 log UFC/ml, demonstrando que a população de *E. coli* foi reduzida pela remoção da contaminação gastrointestinal visível.

Na indústria avícola, a aplicação do critério microbiológico de *E. coli*, como indicador de higiene de processo é amplo e bem difundido, tanto nos países como no comércio internacional. No entanto, a identificação de patótipos de *E. coli* ainda se limita à pesquisa científica que na dependência dos resultados, é fonte norteadora de programas aplicáveis à indústria e à regulamentação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de *E. coli* produtora de toxina Shiga em carcaças de aves comercializadas na cidade de Xanxerê/SC.

3.2 Objetivos específicos

- Enumerar coliformes totais e *E. coli* em carcaças de aves;
- Investigar os genes *stx1*, *stx2*, *eae* em líquido de rinse de carcaças de aves;
- Investigar a presença dos genes *stx1*, *stx2*, *eae* em *E. coli* isolada de carcaças de aves.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, e as amostras de carcaças de aves foram obtidas em pontos comerciais da cidade de Xanxerê.

O município de Xanxerê registra uma população estimada em 49.738 habitantes em 2010, sendo a terceira maior cidade do oeste catarinense, antecedida apenas por Chapecó e Concórdia (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017).

4.1. Delineamento do estudo

O delineamento foi realizado para responder à pergunta de pesquisa “Há carcaças de aves comercializadas no município de Xanxerê com presença de *E. coli* produtora de shigatoxina (STEC)?” Para esta avaliação foi realizado um estudo descritivo a partir de amostragem por conveniência, com aquisição do produto em pontos de venda da cidade de Xanxerê.

A frequência de *E.coli* STEC em carne de aves variam de acordo com as diferentes pesquisas. Doyle e Schoeni (1987) reportaram prevalência de 1,5% ao encontrar 4 amostras positivas em 263 amostras de carne de aves, enquanto Alonso *et al.* (2012) na Argentina, citaram ter encontrado 3,28% e, recentemente no Egito, pesquisa de Younis *et al.* (2017) relatam o achado de 8 amostras de carne de aves com presença de *E.coli* STEC em 120 testadas, resultando em 6,6% de prevalência. No Brasil, pesquisas de *E.coli* STEC em 138 amostras de coxas de frangos realizadas por Costa (2010) resultou em ausência. Também, Alvares, (2011) no Brasil, reportou não ter encontrado STEC ao pesquisar *E.coli* STEC em 100 cortes de aves.

Considerando a importância da *E.coli* STEC como agente zoonótico de risco à saúde, a ocorrência de STEC em alguns países e os poucos relatos em aves no Brasil, este estudo foi delineado para uma prevalência esperada de 1,5%, admitindo um nível de confiança de 95%, tendo sido determinado que seriam necessárias a coleta de no mínimo 198 amostras. Este delineamento assegura com 95% de certeza a capacidade de detecção de no mínimo uma carcaça positiva para *E.coli* STEC (THRUSFIELD, 1986).

Inicialmente, foram sondados 15 pontos de vendas, tendo sido elegível oito deles considerando a localização que representasse o centro e os bairros e o número de *check outs*

(caixas para atendimento). O número de *check outs* foi escolhido como critério de seleção, por ser este um indicador de acesso de consumidores ao ponto de venda. Para garantir a representatividade, as amostras foram colhidas em pontos de venda com no mínimo cinco *check outs*, resultando em oito pontos de vendas que obedeciam a esse critério. O centro da cidade foi representado por um total de 46 *check outs* e os bairros por 48 *check outs* (Tabela 2 e Figura 5).

Tabela 2 – Distribuição dos pontos de venda com coleta de amostras e número de *check outs*

Ponto de amostragem	Localização	Nº Check Outs	% Check Outs
P1	L1 Centro	5	48,9 %
P2	L2 Centro	19	
P3	L3 Centro	16	
P4	L4 Centro	6	
P5	L5 Vista Alegre	6	51,1 %
P6	L6 Esportes	15	
P7	L7 Esportes	5	
P8	L8 Bortolon	22	
TOTAL		94	100%

Fonte: a própria autora

Figura 5 – Distribuição dos pontos de venda com colheita de amostras- Xanxere-SC



Fonte: Adaptado a partir de: Google ([2018]).

O período de coleta das amostras ocorreu de outubro de 2017 a março de 2018. Cada ponto de venda foi visitado 10 vezes com intervalo de 7 a 15 dias para obter amostras de diferentes datas de abate, considerando a renovação das gôndolas. Em cada evento de amostragem, foi colhida uma unidade de produto por categoria e marca, na dependência da disponibilidade de venda dos mesmos nas gôndolas. Cinco categorias de produtos que se apresentavam à venda compuseram o conjunto de amostras: carcaças congeladas de frangos “in natura”, galeto, frangos temperados, galinha (matrizes pesadas) e ave caipira. Os produtos amostrados não levavam em consideração o tipo de fiscalização, Sistema de Inspeção Federal (SIF) ou Sistema de Inspeção Estadual (SIE).

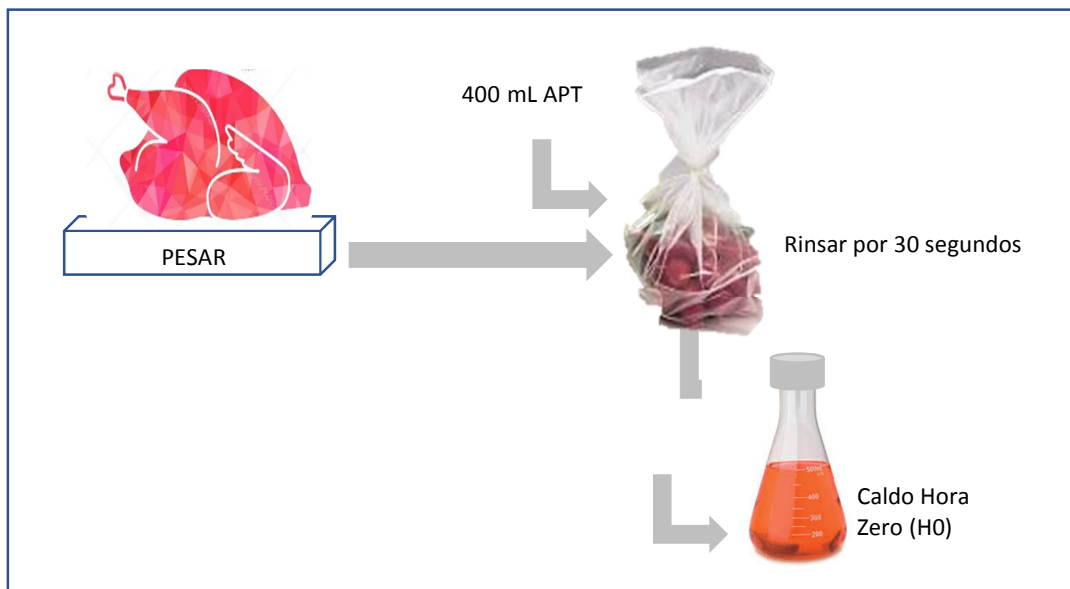
Foi adotado como critério de rejeição da amostra a falta de integridade de embalagem, sendo a amostra substituída por outra da mesma marca. As amostras colhidas foram acondicionadas em caixas isotérmicas e enviadas ao Laboratório do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2 Processamento laboratorial das amostras

No recebimento, o protocolo de entrada constituiu de avaliação da temperatura do produto e registro das amostras. Em seguida iniciou-se o completo descongelamento das amostras sob refrigeração. O excesso de líquido foi drenado das embalagens e os miúdos e pertences, quando presentes, foram removidos assepticamente. As carcaças, sem miúdos e sem pertences, foram transferidas, individualmente, para recipientes plásticos estéreis, seguido de pesagem e registro de peso. A rinsagem das amostras, independente do peso, foi realizada de acordo com a metodologia recomendada pela ISO 17604 (*amendment* 1:2009), adicionando-se 400 mL de água peptonada tamponada 1%. (ATP), conforme recomendação da ISO/TS 13136:2012(E) para diluentes de alimentos congelados (SILVA *et al.*, 2010); INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2015).

A rinsagem foi realizada segurando a carcaça com uma mão e fechando a abertura da bolsa com a outra, rodando por 30 segundos o líquido na bolsa e dentro da cavidade da carcaça, de forma a lavar toda a superfície interna e externa da mesma. O líquido de rinsagem de cada carcaça foi drenado para um recipiente estéril, sendo considerada a unidade analítica hora zero – H0, constituído por aproximadamente 400 mL de líquido de rinsagem (Figura 6).

Figura 6 – Obtenção da unidade analítica Hora Zero (H0) de rinsagem de carcaça aves amostradas no município de Xanxerê



Fonte: a própria autora

4.3 Quantificação de *Escherichia coli* e coliformes totais

A partir da unidade analítica hora zero (H0), foi realizada a quantificação de Coliformes Totais e *E. coli* em meio Chromocult (Merck, Darmstadt) e detecção de *E. coli* em meio Eosin Methylene Blue Agar (EMB, Oxoid), conforme protocolos descritos abaixo. Todas as colônias típicas de *E. coli* obtidas a partir da rinsagem (caldo H0) foram individualmente suspensas em 1 ml de meio Skim Milk 10% (Acumedia) adicionado de 20% de glicerol e armazenadas a -20°C , para posterior pesquisa dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*.

4.3.1 Quantificação de coliformes totais e *E. coli* em Chromocult

Realizou-se a inoculação de 1 ml da unidade analítica H0 em meio Chromocult, através da técnica de semeadura em profundidade com adição de sobrecamada. Após incubação a 36°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 48 horas, as colônias azuis violeta, típicas de *E. coli*, e as colônias *pink*, características de coliformes totais foram contadas.

4.3.2 Detecção de *E. coli* em EMB

Para detecção de *E. coli* em EMB foi realizada a inoculação de 0,1 mL seguindo a técnica de semeadura em superfície. Após a incubação a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 48 horas, colônias típicas de *E. coli*, de cor verde metálica foram armazenadas para posterior análise.

4.3.3 Cálculo do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de coliformes totais e *E. coli* nas carcaças

No procedimento de rinsagem, cada mililitro do lavado correspondeu ao peso da carcaça (em gramas) dividido por 400. A partir disso, a enumeração de coliformes totais ou *E. coli* em Chromocult foi calculado pela fórmula:

UFC de Coliformes totais ou E. coli/ grama de carcaça = número de colônias típicas/ (peso da carcaça/400)

4.4 Pesquisa dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* no líquido de rinsagem das carcaças

A pesquisa de STEC nas carcaças seguiu a metodologia descrita na ISO/TS 13136:2012(E) conforme FIGURA 7) e complementação da ISO/TS 13136:2012(E) conforme (FIGURA 8).

A primeira etapa (Fase I) consistiu no pré-enriquecimento da rinsagem das carcaças em caldo não seletivo com a finalidade de promover o aumento da população bacteriana e a recuperação de células injuriadas, aumentando assim, as chances de isolamento de *E. coli*. Para tanto, foi transferido 1 mL do caldo da unidade analítica Hora Zero (H0) para 9 mL de APT 1%, seguido de incubação por 24h a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), resultando no Caldo Hora Um (H1), o qual foi utilizado para pesquisa dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*.

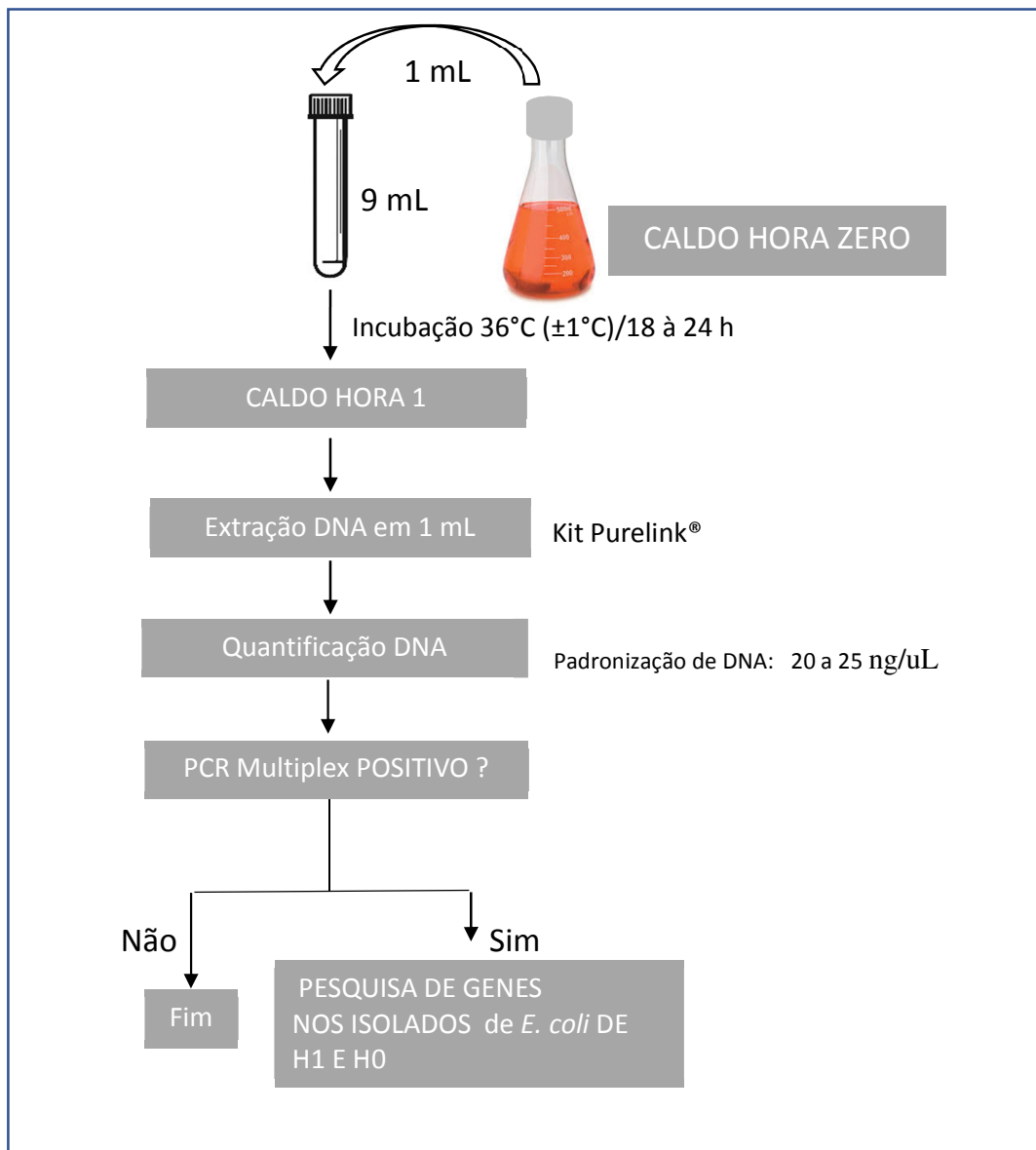
A pesquisa de genes de virulência *stx1*, *stx2* e *eae* foi realizada por PCR multiplex a partir de DNA total extraído do caldo H1 (FIGURA 7). O método ISO/TS 13136:2012(E) indica realizar o isolamento de *E. coli* apenas em amostras onde houver a detecção do gene *stx* (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2012), no entanto o presente estudo complementou o método ISO/TS 13136:2012(E) ao pesquisar genes de virulências nas alíquotas do caldo H1 provenientes de amostras positivas para no mínimo um gene na Fase I, visando obter isolados portadores de um dos genes para estudos posteriores e ampliar as chances de encontrar os genes de virulência em caldo H1 e nas colônias. Alíquotas de caldo H1 foram semeadas em Chromoagar e incubadas por 24h a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) para

isolamento de *E. coli* (Fase II; FIGURA 8). Das colônias obtidas, foram escolhidas até 50 colônias por amostra para investigação dos genes de virulência. De cada colônia foi extraído DNA total e 1 µL da extração foi reunido em cinco *pools* de DNA originados de 10 colônias. Os *pools* foram submetidos ao PCR multiplex para detecção dos genes de virulência de STEC. Os *pools* que resultaram positivos para pelo menos um dos genes de virulência tiveram as 10 alíquotas de DNA, que compuseram o referido *pool*, testadas individualmente por PCR multiplex para detecção dos genes de virulência (FIGURA 8).

4.5 Pesquisa dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* em colônias típicas de *E. coli* –Hora Zero

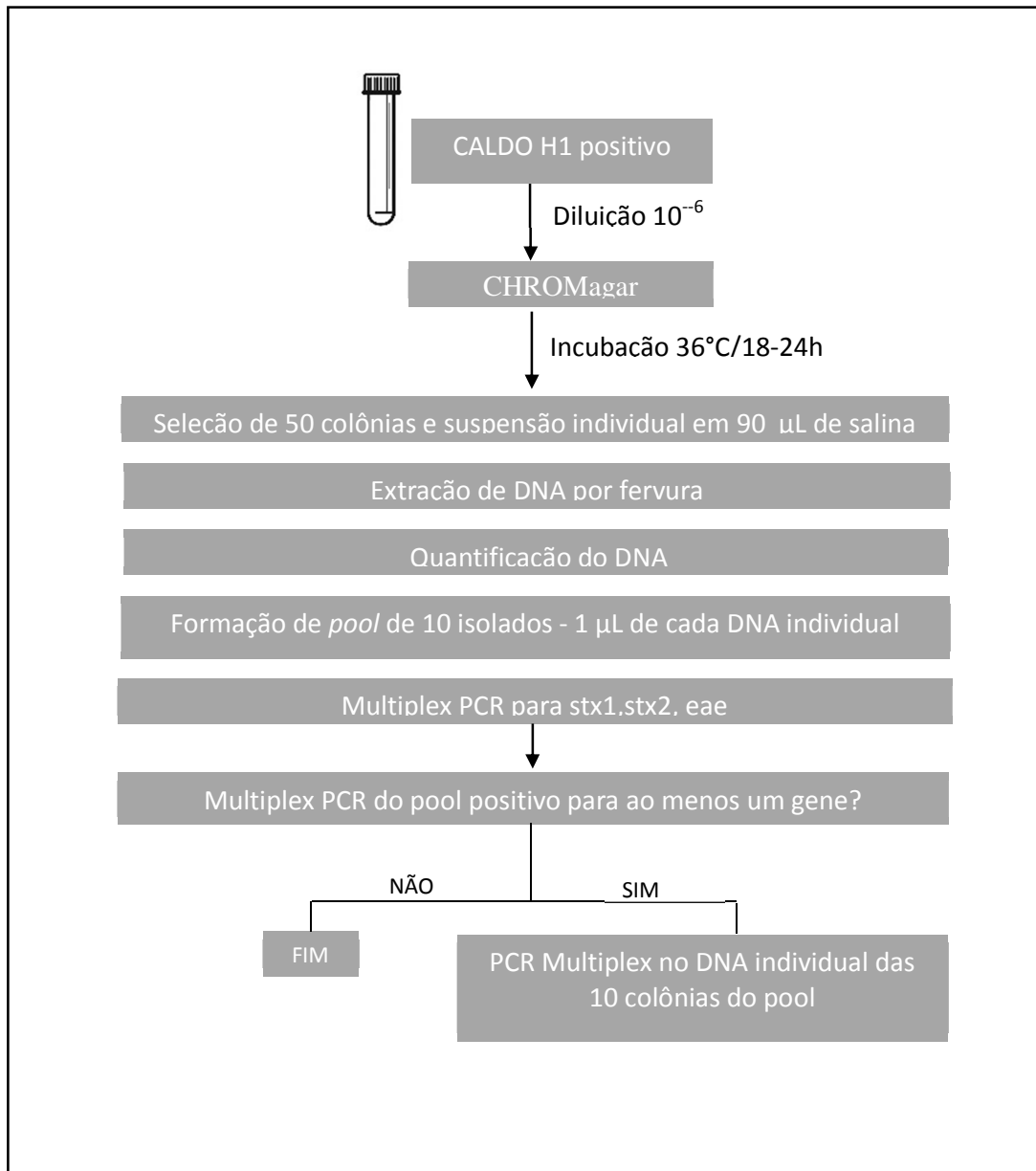
As colônias típicas de *E.coli* isoladas a partir de H0 provenientes de carcaças que tiveram a amplificação de pelo menos um gene de virulência a partir do DNA total extraído do caldo H1 foram investigadas, individualmente, para a presença de *stx1*, *stx2* e *eae*. As colônias mantidas a -20°C foram recuperadas em caldo BHI e isoladas em ágar Triptose de Soja (Merck). Após, procedeu-se a extração de DNA total e a detecção dos genes por PCR multiplex.

Figura 7 – Pesquisa de genes de virulência *stx1*, *stx2* e *eae* no Caldo Hora 1 (Fase I)



Fonte: a autora

Figura 8 – Pesquisa de genes de virulência *stx1*, *stx2* e *eae* no *pool* de DNA extraído de colônias típicas de *E.coli* isoladas de caldo H1 positivos na Fase I



Fonte: a autora

4.6 Extração do DNA total do caldo H1

A extração do DNA total foi realizada com o Kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen™). Foi transferido 1 mL do caldo H1 para microtubo descartável e procedeu-se a extração do DNA total conforme instruções do fabricante. Após a extração, foi verificada a

concentração do DNA no quantificador Quantus™ Fluorometer (Promega®), sendo padronizada a concentração do DNA total entre 10 e 25 ng/uL e armazenados a -20°C.

4.7 Extração de DNA de colônias típicas de *E.coli*

A extração de DNA de colônias de *E.coli* foi realizada pelo método de fervura. Uma colônia individual foi suspensa em 90uL de solução salina 0,85% e aquecida a 95°C por 5 minutos, seguido de resfriamento por 5 minutos. O ciclo foi repetido por mais uma vez. O DNA extraído foi quantificado em NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Cientific) padronizando-se a concentração em 10 ng/uL.

4.8 Pesquisa de genes *stx1*, *stx2* e *eae* por PCR Multiplex

A pesquisa de genes *stx1*, *stx2* e *eae* foi realizada por PCR Multiplex, conforme descrito por Souza *et al.* (2013), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 3. Cada reação foi estabelecida para um volume final de 25µL, sendo: 10,5µL de água ultrapura estéril, 0,25µL de cada primer (20 pmol/µL), 5µL de tampão 10X PCR Rxn Buffer (Invitrogen®), 2,5 µL MgCl₂ (50mM), 2,5 µL dNTP's mix (10mM), 0,5 µL Taq Polimerase 5 U/µL (Invitrogen®) e 2,5µL de DNA. A amplificação dos genes foi realizada em termociclador modelo Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) com as seguintes condições: 1 minuto a 95°C; seguido de 35 ciclos (50s a 95°C, 30s a 62°C e 30s a 72°C); e 10 minuto a 72°C. Os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, adicionado de Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia). As amostras foram visualizadas em transiluminador (Kasvi®) comparando-se os fragmentos com marcador de massa molecular de 100pb GelPilot (Qiagen). Para todas as reações, água ultrapura estéril foi utilizada como controle negativo e a cepa *Escherichia coli* CDC2010C-3114 O11:H8 foi utilizada como controle positivo.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* por PCR multiplex

Gene Alvo	Sequencia 5' - 3'	Fragmento esperado (pb)	Referência
stx1F	AGT CGT ACG GGG ATG CAG ATA AAT	417	Bellin <i>et al.</i> (2001)
stx1R	CCG GAC ACA TAG AAG GAA ACT CAT		
stx2F	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC	255	Paton e Paton (1998)
stx2R	TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G		
eaeF	ACT GGA CTT CTT ATT RCC GTT CTA TG	189	Hardegen <i>et al.</i> (2010)
eaeR	CCT AAA CGG GTA TTA TCA CCA GA		

Fonte: a autora

4.9 Confirmação da identidade de colônias típicas de *E.coli*

Todas as colônias típicas de *E.coli* que apresentaram ao menos um gene de virulência detectado na PCR multiplex foram confirmadas por testes bioquímicos de rotina, como descrito por MARKEY *et al.* (2013).

4.10 Análise dos dados

Os dados de distribuição de categorias de produtos amostrados e local de obtenção dos mesmos e frequência de amostras positivas para os genes investigados foram analisados por estatística descritiva. A partir das enumerações de colônias típicas de Coliformes Totais e *E. coli* nas carcaças, foram realizados os cálculos de mediana, mínimo e máximo.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra de carcaças de aves analisada

O total de 246 carcaças de aves adquiridas no comércio de Xanxerê foi composto por 117 (47,56%) amostras provenientes da região central e 129 (52,44%) amostras dos pontos de vendas localizados nos bairros (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição das carcaças de aves amostradas de acordo com a localização do ponto de venda e número de check outs

Ponto de venda	Localização	Nº de outs	check Número Amostras	%
P1	Centro	5	31	12,60
P2	Centro	19	35	14,23
P3	Centro	16	35	14,23
P4	Centro	6	16	6,50
P5	Bairro Vista Alegre	6	31	12,60
P6	Bairro Esportes	15	45	18,29
P7	Bairro Esportes	5	20	8,13
P8	Bairro Bortolon	22	33	13,41
TOTAL		94	246	100,00%

Fonte: a própria autora

Em cada coleta foram adquiridas de uma a sete amostras por ponto de venda, totalizando de 23 a 25 amostras analisadas em cada um dos dez eventos de amostragem. A principal categoria encontrada para comercialização foi o frango “in natura”, enquanto o menos disponível foi o frango caipira (Tabela 5). A categoria frango “in natura” estava disponível ao consumidor em todos os pontos de venda e em todos os eventos de amostragem, sendo, portanto, a mais encontrada e a com maior variedade de marcas no comércio do município. As demais categorias nem sempre estavam disponíveis nos eventos de amostragem. O número de pontos de vendas em que as categorias estavam disponíveis resumem-se na seguinte distribuição: galinha (7); galeto (7); Frango “in natura” (8), frango temperado (8) e Frango caipira (2).

Tabela 5 – Número de carcaças amostradas por categoria de acordo com a disponibilidade nos pontos de vendas nos eventos de coleta

Categoria	Número de amostras	%
Frango “in natura”	139	57%
Galinha	39	16%
Galeto	37	15%
Frango Temperado	26	11%
Frango Caipira	5	2%
Total Geral	246	100%

Fonte: a própria autora

As 246 amostras de carcaças de aves estavam distribuídas entre 13 diferentes marcas (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L e M), que foram obtidas na frequência amostral de uma a 63 vezes (Tabela 6). Os pontos de venda apresentaram no mínimo quatro marcas de produto disponíveis ao consumidor. A marca B foi a mais frequentemente disponível, estando presente em sete dos oito pontos de venda, seguido da marca H presente em seis locais. Por outro lado, as marcas E, F, G eram comercializadas em apenas um ponto de venda.

Tabela 6 – Distribuição das treze marcas de carcaça de aves amostradas de acordo com os pontos de venda

Marca	Ponto de venda								Amostras adquiridas	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Número	% do total
A			10				7	3	20	8,1
B	7	10	19		5	4	6	12	63	25,6
C		9				7		5	21	8,5
D		12		9	8	18		10	57	23,2
E					1				1	0,4
F					2				2	0,8
G					1				1	0,4
H	5	1	1	1		2		1	11	4,5
I	14				10		2		26	10,6
J		1						2	3	1,2
K	1		5	1		10			17	6,9
L	4						1		5	2,0
M		2		5	4	4	4		19	7,7
Total	31	35	35	16	31	45	20	33	246	100%

Fonte: a própria autora

Do total de amostras, 227 (92,3%) foram provenientes de 16 estabelecimentos de abate que contam com Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Apenas a marca M, com 19 amostras (7,7%), procedeu de um estabelecimento produtor de galinha congelada sob Serviço de Inspeção Estadual (SIE).

Tabela 7 – Distribuição de amostras de carcaça de aves provenientes de estabelecimentos de abate e processamento com sistema de inspeção federal (SIF) ou estadual (SIE) entre os pontos de venda

Ponto de venda	Amostras Avaliadas	Sistema Inspeção do estabelecimento de abate		% com SIF
		Federal	Estadual	
P1	31	31	0	100,0
P2	35	33	2	94,3
P3	35	35	0	100,0
P4	16	11	5	68,7
P5	31	27	4	87,1
P6	45	41	4	91,1
P7	20	16	4	80,0
P8	33	33	0	100,0
TOTAL	246	227	19	92,3%

Fonte: a própria autora

As amostras colhidas apresentaram embalagens íntegras, rotulagem de acordo com o conteúdo, dentro do período de validade e com data de produção entre 19 de fevereiro de 2017 a 18 de fevereiro de 2018, representando um total de 83 dias diferentes de abate. Observou-se nas lojas que os produtos estavam bem conservados, com reposição nos intervalos entre os eventos de coletas. As categorias galinha e frango “in natura” apresentaram o maior frescor, considerando o menor tempo decorrido entre data de produção descrita na embalagem e disposição para venda ao consumidor. Galeto e frango caipira apresentaram o maior intervalo entre o abate e a comercialização, mostrando ser produtos com menor giro comercial e consumo.

5.2. Enumeração de Coliformes Totais e *Escherichia coli*

Das 246 carcaças avaliadas a partir do caldo H0 semeado em ágar Chromocult, 89,8% (221/246) apresentavam colônias típicas de coliformes totais, em quantidade que variou do limite de quantificação 1 até 2.836,1 UFC.g⁻¹ (Tabela 8). A mediana de coliformes totais foi de 5,2 UFC.g⁻¹. Também no ágar Chromocult, 73,2% (180/246) das carcaças apresentaram colônias típicas de *E.coli*. O número de colônias típicas variou do limite de quantificação 1 até 242 UFC.g⁻¹, sendo a mediana calculada em 0,6 UFC.g⁻¹ (Tabela 8). A categoria Galinha foi a que apresentou o número mais elevado de ambos os indicadores, seguida do Frango “in natura”.

Tabela 8 – Enumeração de coliformes totais (UFC.g⁻¹) e *E. coli* (UFC.g⁻¹) em carcaças de aves comercializadas na cidade de Xanxerê

Categoria	Número de amostras	Coliformes Totais (UFC.g ⁻¹)		<i>Escherichia coli</i> (UFC.g ⁻¹)	
		Mediana	Máximo	Mediana	Máximo
Frango “in natura”	139	5,3	480	0,8	36,8
Galinha	39	37,7	2.836,1	3,3	242,7
Galeto	37	0,5	46,5	0*	17,3
Frango temperado	26	0,8	13	0,1	2,3
Frango caipira	5	1,3	11,7	0*	0,8
Total	246	5,2	2.836,1	0,6	242,7

Fonte: a própria autora

* Não detectado

Em relação à ausência de *E.coli* nas categorias de produtos amostrados, observa-se que as categorias Frango Caipira e Galeto apresentaram a maior frequência de amostras sem isolamento dessa bactéria (Tabela 9).

Tabela 9 – Frequência de amostras com ausência de colônias típicas de *Escherichia coli* em meio Chromocult de acordo com a categoria de produtos comercializados na cidade de Xanxerê/SC

Categoria	Número de amostras	Ausência de colônias típicas de <i>Escherichia coli</i>	
		Número	%
Frango “in natura”	139	27	19,42
Galinha	39	3	7,69
Galeto	37	21	56,75
Frango temperado	26	12	46,15
Frango caipira	5	3	60,0
TOTAL	246	66	26,82

Fonte: a própria autora

A detecção de *E.coli* foi realizada em ágar EMB em paralelo ao ágar Chromocult, sendo que o ágar EMB apresentou maior frequência de amostras com ausência de colônias típicas (46,34%) em comparação ao ágar Chromocult (26,82%), demonstrando que há mais dificuldade de seleção de colônias típicas de *E.coli* em ágar EMB em comparação ao ágar Chromocult.

5.3. Pesquisa dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* em caldo H1

Os caldos H1, proveniente das 246 amostras de carcaças comercializadas na cidade de Xanxerê, foram negativos para os genes *stx1* e *stx2*. Dessa forma, a partir dos critérios constantes na ISO/TS 13136:2012(E), houve ausência de carcaças positivas para STEC (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2012). Entretanto, 25 amostras (10,16%) foram positivas para o gene *eae* em H1 e, portanto, prosseguiu-se a investigação da presença dos genes em colônias típicas de *E.coli* obtidas a partir das 25 carcaças positivas.

5.4. Pesquisa dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* em colônias típicas de *E.coli* originadas de carcaças positivas para *eae* em H1

Das 1.715 colônias típicas de *E.coli* originadas de H0 e isoladas em Chromocult e EMB, ou isoladas em Chromoagar partir de H1, que foram investigadas sob forma de 159 *pools* de 10 colônias para a presença dos genes *stx1* e *stx2*, tendo todas sido negativas. Esse resultado está de acordo com aquele obtido a partir da pesquisa desses genes diretamente no caldo H1 e confirma a ausência de STEC nas amostras testadas.

Por outro lado, em 40 (25,15%) dos 159 *pools* de colônias houve a amplificação do gene *eae*. Os 40 *pools* positivos foram provenientes de colônias típicas obtidas em Chromoagar (n=31) e Chromocult (n=9). Do total de 125 *pools* de colônias típicas obtidos do Chromoagar, 24,8% foram positivos para *eae*; enquanto, dos 24 *pools* obtidos a partir de colônias típicas em Chromocult, 38% foram positivos. Nenhum dos dez *pools* formados com colônias típicas em EMB foi positivo para *eae*.

Das 400 colônias típicas testadas, individualmente, a partir dos *pools* positivos, 184 (46%) apresentam genes *eae*. Em relação aos *pools* de origem, 169 colônias positivas foram proveniente dos 31 *pools* positivos originados do Chromoagar (169/ 310 colônias; 54,4%) e 15 colônias dos nove *pools* positivos do Chromocult (15/90 colônias; 17%). Das 169 colônias típicas com amplificação do gene *eae*, 149 foram identificadas como *E.coli*. Em termos de confirmação, todos os *pools* positivos para *eae* apresentaram ao menos uma colônia confirmada como *E.coli* com amplificação positiva desse gene, validando o resultado obtido na etapa anterior.

Os *pools* confirmados como positivos para *eae* foram provenientes de 12 amostras de carcaça de ave (4,88% do total). Dessas, quatro amostras foram positivas apenas em *pools* obtidos do caldo H0, cinco amostras apenas em *pools* de H1 e três em *pools* de ambas as origens. As amostras de carcaça de ave com *pools* confirmados para a presença de *E.coli eae+* estavam distribuídas entre as categorias Frango “in natura” (n=9), e Galeto (n=3), sob Sistema de Inspeção Federal. A distribuição das amostras com presença de *E.coli eae+* entre as marcas comerciais e a percentagem de positivos em relação ao total analisado da referida marca, foi como segue: A (n=2; 10%); B (n=3; 4,76%), C (n=3; 14,28%) e D (n=5; 8,77%), nas demais nove marcas não houve detecção.

6 DISCUSSÃO

A carne de aves é a mais consumida no Brasil entre todas as espécies, com consumo de 41,1 Kg per capita em 2016 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL, 2017). A disponibilidade de carcaças de aves nas gôndolas comprovou a extensa variedade de produtos e marcas de aves ofertadas ao consumidor, sendo a categoria frangos *in natura* a que tem a maior variedade de ofertas em relação às carcaças das demais categorias estudadas nesta pesquisa. Observou-se também que, independente de localização dos supermercados, após dez ciclos de amostragem, a distribuição das 246 carcaças colhidas foi equitativa entre centro e bairro, sendo 47,56% (117) provenientes de supermercados do centro e 52,44% (129) de bairros. Este perfil contribuiu para avaliar o produto disponível à venda, independentemente de classe social consumidora, localização do ponto de venda e marca. Os produtos analisados eram pertencentes a 13 diferentes marcas adquiridas na frequência de uma vez até o máximo de 63 vezes, na dependência da disponibilidade no ponto de venda. As duas marcas mais frequentes nos pontos de venda foram B e D, que representam grandes produtores e exportadores. A marca B, com 63 amostras avaliadas (25,6%) esteve frequentemente nas gôndolas de sete dos oito pontos de venda, seguida da marca D com 57 amostras avaliadas (23,2%) e disponível em cinco pontos de venda. Das 13 marcas avaliadas, 12 eram estabelecimentos sob Sistema de Inspeção Federal (SIF), dos quais 11 são aprovados para exportar. Estas informações indicam perfil sanitário equivalente do produto nacional e exportação, cujo abate das aves tem regime de fiscalização federal permanente, com foco em inocuidade e controle sanitário do produto e processo.

A categoria frango *in natura*, sempre presente nos pontos de venda em todos os eventos de amostragem, representou 57% (139) dos produtos adquiridos, sugerindo que a preferência do consumidor ainda é por carcaça de frango “*in natura*” de aves, possivelmente pela sua facilidade de preparos e custos competitivos. Em relação às demais categorias, as quantidades de produtos nas gôndolas eram menores e nem sempre disponíveis, tendo a categoria galinha representando 16% (39) da amostra, a categoria galeto 15% (37), o frango temperado 11% (26) e frango caipira 2% (5). Esta última categoria esteve disponível em apenas dois supermercados durante todos os eventos de amostragem e esteve poucas vezes presentes nas gôndolas. Assim, nas categorias carcaças de aves, o frango “*in natura*” é o produto líder na preferência do consumidor entre os demais tipos de carcaças de aves e deve, portanto, ser priorizada nas investigações relativas à inocuidade da carne de ave.

A enumeração de coliformes totais das 246 carcaças, resultou em 25 /246 (10,2%) das carcaças com ausência de colônias típicas e 221/246 (89,8%) positivas, com mediana de 5,2, UFC.g⁻¹. A contagem máxima de coliforme total foi de 2.836,1 UFC.g⁻¹, ou seja, 2,8x10³ UFC.g⁻¹. A legislação brasileira, RDC n° 12 (BRASIL, 2001), estabelece coliformes a 45°C como parâmetro de avaliação de carcaças de aves. Para amostras indicativas, o número máximo admitido é 10⁴ UFC/g. Considerando que os coliformes a 45°C são um subgrupo dos coliformes totais, podemos considerar que todas as carcaças analisadas estavam de acordo com esse parâmetro e, portanto, em condição higiênico-sanitária satisfatória.

Segundo Ghafir *et al.* (2008), o indicador *Escherichia coli* é o que melhor correlaciona à zoonose de origem alimentar, por sempre se fazer presente no trato gastrointestinal dos animais. Neste sentido, a enumeração de colônias típicas de *E. coli* demonstrou que 26,82% das carcaças foram negativas para essa bactéria em 1 mL do líquido de rinsagem das carcaças. Nas demais carcaças a mediana foi baixa (0,6 UFC.g⁻¹) e o máximo detectado foi 3,3 UFC.g⁻¹. Este resultado é relevante, considerando a importância de *E. coli* como patógeno veiculado por alimentos e como indicador de higiene do processo, permitindo concluir que as carcaças comercializadas em Xanxerê apresentam apropriado nível higiênico sanitário. Os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados por Altekruze *et al.*, (2009) que observaram 0,8 UFC/mL em rinsagem de carcaças após resfriamento e observaram que abatedouros com média de *E. coli* menores ou iguais a 1,1 UFC/mL tinham menor ocorrência de patógenos como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp em relação ao conjunto de abatedouros analisados.

Considerando a relevância da STEC para a saúde pública, a investigação deste patotipo foi o principal objetivo desta pesquisa. Diversos estudos demonstraram que menos de 100 células de STEC podem ser suficientes para causar infecção, indicando que deve haver ausência desse patotipo nos alimentos (SOFOS, 2008; BACH *et al.*, 2002; MAO; DOYLE; CHEN, 2006). Embora cepas de STEC colonizem o intestino de diversas espécies animais e possam contaminar as carcaças durante o processo de abate, mantendo a sobrevivência em uma gama de condições de temperatura (MIRI *et al.*, 2014), as 246 amostras de carcaças de aves submetidas ao critério de análise da ISO/TS 13136:2012(E) descrito pela Organização de Padronização Internacional (2012), indicam com 95% de confiança que STEC não ocorre em prevalência igual ou superior a 1,5% em carcaças de aves comercializadas na cidade de Xanxerê/SC. Este perfil pode ser justificado pela organização da cadeia agroindustrial brasileira, que mantém um sistema de produção verticalizado com princípios rigorosos de criação animal com regras rígidas de biossegurança, higienização, vazios sanitários e abates que

operam com gestão de qualidade e segurança dos alimentos. Os resultados obtidos nesta pesquisa, são compatíveis aos reportados por Alvares (2011) que não encontrou cepas de STEC ao analisar 100 cortes de aves no comércio varejista da Grande São Paulo e Costa (2010) que não encontrou STEC ao analisar 138 amostras de coxas de frango ao comercializadas na cidade de São Paulo. Os achados desta pesquisa também estão em consonância com as citações de Wani *et al.* (2004) em referência aos dados obtidos por Kobayashi, Pohjanvirta e Pelkonan (2002), os quais não encontraram STEC em amostras fecais de 199 frangos na Finlândia. Em outro estudo em que foram avaliadas 987 amostras de carne de aves, 22 amostras (2,2%) foram positivas para *E.coli* O157, mas apenas nove amostras (0,91%) foram positivas para todos os genes de virulência estudados *stx1*, *stx2*, *eaeA* e *ehxA* (LUKÁSOVÁ; ABRAHAM, B; CUPÁKOVÁ, 2004). No relatório da EFSA do ano de 2015, de 220 amostras de carne de frango testadas na Europa, somente um isolado de STEC foi encontrada em carne de frango (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016), corroborando com o indicativo de baixa prevalência do patógeno em carne de frangos. Apesar disso, é relevante considerar que Doyle e Schoeni (1987) demonstraram a presença de *E. coli* O157 em 1,5% das carcaças e Lee *et al.* (2009), na Coreia, identificaram 4,6% (41/900) de carnes de aves positivas. Estas prevalências são complementadas pelas recentes pesquisas de Alonso *et al.* (2016), que alertam que o consumo de produtos de frango pode ter relação com infecções graves por STEC e de Younis *et al.* (2017) que reportaram no Egito a ocorrência de 6,6% de amostras de carne de aves congeladas positivas para STEC.

O método ISO / TR 13136:2012 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2012) demonstrou ser uma estratégia de triagem eficaz, tendo sido confirmados os resultados obtidos diretamente do caldo, tanto no *pool* de colônias como nas colônias isoladas, havendo ausência de *stx* e presença de *eae*. Pelo critério desse protocolo, a investigação de STEC teria resultado negativo já na etapa de triagem, resultando em rapidez de diagnóstico. Porém, para efeito de investigação científica, as amostras *eae* positivas foram submetidas à detecção de genes *stx* e *eae* nas colônias obtidas nos meios sólidos, com objetivo de complementar a pesquisa de genes *stx* nos isolados e obter os isolados de *E.coli* portadora de gene *eae* para estudos posteriores. Dos 159 pools de colônias analisadas, 40 foram positivos e em todos os pools ao menos uma colônia foi confirmada como *eae* positiva e 149 colônias positivas foram confirmadas como *E. coli*. Em relação ao total de amostras, foram encontradas 12 (4,88%) carcaças com a presença de *E. coli eae*⁺. Dessas, quatro amostras foram positivas a partir de colônias isoladas a partir do caldo H0, cinco amostras apenas em *pools* de H1 e três em *pools* de ambas as origens. A discrepância de resultados entre H0 e H1

justifica-se pela dinâmica de crescimento de diferentes cepas no caldo de pré enriquecimento e pela limitação do poder de detecção inerente ao isolamento em meios sólidos. Do ponto de vista de detecção de cepas de *E. coli eae*⁺, a associação dos métodos, mesmo que mais laborioso e dispendioso, demonstrou aumentar o poder de detecção de carcaças positivas.

A detecção de cepas de *E. coli eae*⁺ pode ser interpretada como presença do patotipo EPEC em 12/246 (4,88%) das amostras de carcaças analisadas na presente pesquisa. As cepas que apresentam o gene *eae* podem ser tanto STEC quanto EPEC e são caracterizadas pela sua capacidade de causar a lesão “Attaching and effacing” no enterócito. Porém, enquanto em STEC os principais fatores de virulência são as toxinas Shiga codificadas pelos genes *stx*, em EPEC estes genes são ausentes (DONNENBERG *et al.*, 1993; NATARO; KAPER, 1998). Por sua vez, cepas de EPEC apresentam fator de virulência, que não foi objeto de investigação no presente estudo. O pilus tipo IV (BFP) codificado pelo gene *bfpA*, carregado no plasmídeo de aderência EPEC (EAF) está presente em cepas EPEC típicas. Por outro lado, cepas atípicas de EPEC, carregam o gene *eae*, porém não apresentam o *bfpA*. Estudo conduzido por Alonso *et al.* (2012) na Argentina, investigou a presença de genes *eae* e *stx*, como indicadores da presença de EPEC e STEC em hamburguers de aves, miúdos, carcaças de frango e suabe de cloaca. Como critério, a detecção de *eae* e ausência de *stx* indicava que a amostra tinha a presença de EPEC. Especificamente em relação à carcaça de frango, os autores encontraram 3,9% de amostras positivas, todas elas classificadas como EPEC atípica.

A relevância de cepas tEPEC, cepas típicas de EPEC, como causadora de enterite em crianças menores de 5 anos é reconhecida, sendo um dos principais causadores de diarreia em países em desenvolvimento. No caso das aEPEC, cepas atípicas, a relevância ainda é controversa, pois pode ser isolada em pacientes com quadro de diarreia ou assintomáticos (HU; TORRES, 2015). Ao contrário de cepas tEPEC, causadoras de diarreia em humanos, as quais raramente são encontradas em animais, cepas aEPEC são frequentemente relatadas em animais e no ambiente. O potencial zoonótico dessas cepas, por sua vez, ainda precisa ser elucidado (GOMES *et al.*, 2016). Nesse sentido, Alonso *et al.* (2016) encontraram cepas de aEPEC (O8:H-), já reportadas como causadoras de diarreia em humanos, em frangos e produtos derivados, e alertam para a necessidade de maior investigação da importância da carne de frango como veículo dessas cepas. Dessa forma, é possível concluir que havia presença de EPEC nas 12 carcaças positivas no presente estudo, necessitando, ainda, elucidar se são cepas típicas (tEPEC) ou atípicas (aEPEC).

7 CONCLUSÕES

1. As carcaças de ave comercializadas em Xanxerê apresentam baixas contagens de coliformes totais e *Escherichia coli*, indicando qualidade higiênico-sanitária satisfatória do processo de elaboração do produto.
2. Há ausência de carcaças de ave contaminadas com *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina (STEC), considerando um poder de detecção de prevalência igual ou maior que 1,5% na população amostrada.
3. A presença de *E. coli eae+* detectada nas amostras analisadas indica que há cepas enteropatogênicas (EPEC) presentes em carcaças de aves. A classificação das cepas EPEC em típicas ou atípicas ainda necessita ser investigada.

O presente estudo confere um grau de segurança ao consumidor, governos e empresas quanto a não incidência de STEC em carcaças de aves congeladas à nível de prevalência de 1,5% e confiança de 95%. No entanto, estudos devem ser complementados considerando a dinâmica da produção e interações de STEC entre espécies animais, bem como a continuidade da pesquisa científica sobre a ocorrência de *E. coli* Enteropatogénica (EPEC) em carne de aves e sua relação com a saúde pública.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA FILHO, E. S. *et al.* Pesquisa de *Salmonella* ssp em carcaças de frango (*Gallus gallus*), comercializadas em feira livre ou em supermercado no município de Cuiabá, MT, Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 74-79, jul. 2003.

ALTEKRUSE, S. F. *et al.* Enumeration of *Escherichia coli* cells on chicken carcasses as a potential measure of microbial process control in a random selection of slaughter establishments in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 11, p. 3522–3527, June 2009.

ALONSO, M. Z. *et al.* Enteropathogenic (EPEC) and shigatoxicogenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. **Food Control**, Kidlington, v. 23, n. 2, p. 351-355, Feb. 2012.

ALONSO, M. Z. *et al.* Serotypes, virulence profiles and stx subtypes of shigatoxicogenic *Escherichia coli* isolated from chicken derived products. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 48, n. 4, p. 325-328, Oct. 2016.

ALVARES, P. P. **Ocorrência e caracterização de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga na linha de abate de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de bovinos e de aves comercializados na região da Grande São Paulo**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bromatologia)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ÁLVAREZ-ASTORGA, M. *et al.* Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. **Meat Science**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 45-50, Sept. 2002. DOI: 10.1016 / S0309-1740 (01) 00225-X.

ASSIS, A. C. B.; SANTOS, B. M. Patogenicity *in vivo* and *in vitro* of *Escherichia coli* samples from avian origin. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3 n. 2, maio/ago.2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2001000200007>. Acesso em: 20 mar. 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2017**. São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

AUVRAY, F. *et al.* Development of a 5'-nuclease PCR assay for the identification of *Escherichia coli* strains expressing the flagellar antigen H21 and their detection in food after enrichment. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 899-905, Mar. 2008.

BACH, S. J. *et al.* Transmission and control of *Escherichia coli* O157:H7: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 82, n. 4, p. 475-490, 2002.

BARCELOS, A. S. **Avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate pela inspeção sanitária**. 2005. xii, 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. In: BERCHIERI JUNIOR, A. *et al.* (Ed.). **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 455-469. BEERY, J. T.; DOYLE, M P.; SCHOENI, J. L. Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 49, n. 2, p. 310-315, Feb. 1985.

BELLIN T. *et al.* Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 39, n. 1, p. 370-374, Jan. 2001.

BEUTIN, L. *et al.* Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven 57 different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, D.C., v. 1, n. 31, p. 2483-2488, Sept. 1993.

BLANCO, J. *et al.* Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 228, n. 4, p. 345-351, Apr. 2003.

BONO, J. L. *et al.* Association of *Escherichia coli* O157:H7 tir polymorphisms with 453 human infection. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 7, p. 98, Aug. 2007.

BOYD, E. F.; HARTL, D. L. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **Journal of Bacteriology**. Washington, DC, v. 180, n. 5, p. 1159-1165, Mar. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 27 jun. 2018.

BRASIL. Decreto nº 9013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 30 mar. 2017. Seção 1, p. 3.

CALDORIN, M. *et al.* Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Brazil and its public health importance. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 10, n. 110, p. 4-20, fev. 2013.

CAMPOS, T. A. **Caracterização clonal e biológica de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária**. 2006. 109 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CARDOZO, M. V. **Deteção de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em peixes de pisciculturas e de vida livre**. 2014. x, 77 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/122015>>. Acesso em: 15 out. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National notifiable diseases surveillance system**. Atlanta, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ndss/conditions/shiga-toxin-producing-escherichia-coli-definition/2018>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

CHAI, S. J. *et al.* Poultry: the most common food in outbreaks with known pathogens, United States, 1998-2012. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 145, n. 2, p. 316-325, Jan. 2017. : 10.1017 / S0950268816002375.

CHINEN, I. *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 2/3, p. 167-171, June. 2009.

COLMEGNA, S. *et al.* Microbiological characteristics of poultry meats: results of inspections carried out in the province of Milano, Italy. **Italian Journal of Animal Science**, Pavia, v. 8, p. 765-770, 2009.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios (Texto relevante para efeitos do EEE). **Jornal Oficial da União, Européia**, [s.l.], L 338, p. 1-26, 22 dez. 2005. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:PT:PDF>>. Acesso em: 25 jun. 2018.

CORNICK, N. A.; BOOHER, S. L.; MOON, H. W. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 70, n. 5, p. 2704-2707, May 2002.

CORRÊA, F. A. F. **Características do patótipos de *E. coli* e implicações de *E. coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2012. ii, 34 f. Trabalho apresentado junto à disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

COSTA, C. A. R. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo**. 2010. 112 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DE PAULA, C. J. S.; MARIN, J. M. Occurrence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dogs with diarrhea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1682-1686, Sept. 2008

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, Paris, v. 30, n. 2/3, p. 299-316, Mar./June 1999.

DONNENBERG, M. S. *et al.* The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 92, n. 3, p. 1418-1424, Sept. 1993.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 53, n. 10, p. 2394-2396, Oct. 1987.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. **EFSA Journal**, Parma, v. 14, n. 12, p. 1- 231, Dec. 2016.

FAGUNDES, L. K. **Caracterização molecular, formação de biofilme e susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *E. coli* de aderência difusa Afa/Dr e não Afa/Dr**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas)-Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

FAIRBROTHER, J. M.; GYLES, C. L. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B. E. *et al.* (Ed.). **Diseases of swine**. Oxford: Blackwell Science, 2006. p. 639-674.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. Silver Spring: 2011. cap. 4A.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Recommended international code of practice general principles of food hygiene**. [Rome], 2003. Adopted 1969. Amendment 1999. Revisions 1997 and 2003. Disponível em: <www.fao.org/input/download/standards/23/CXP_001e.pdf>. Acesso em: 12 maio 2018.

FRANKEL, G. *et al.* Intimin and the host cell: is it bound to end in Tir(s)? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 5, p. 214-218, May 2001.

FRATAMICO, P. M.; SMITH, J. L.; BUCHANAN, R. L. *Escherichia coli*. In: CLIVER, D. O.; RIEMANN, H. P. (Ed.). **Foodborne diseases**. 2nd ed. New York: Academic Press, 2002. p. 79-101.

FREMAUX B. *et al.* Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 89-99, Jan. 2007.

GERBER, A. *et al.* Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997–2000, in Germany and Austria: a prospective study. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 186, n. 4, p. 493-500, Aug. 2002.

GHAFIR, Y. *et al.* Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 71, n. 1, p. 35-45, Jan. 2008.

GOBERT A. P. *et al.* Modulation of chemokine gene expression by Shiga-toxin producing *Escherichia coli* belonging to various origins and serotypes. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10, n. 2, p. 159-165, Feb. 2008.

GOMES, T. A. T. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, p. 3-30, Dec. 2016. Supplement 1. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v47s1/1517-8382-bjm-47-s1-0003.pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2018.

GUIMARÃES, R. A. *et al.* Caracterização filogenética molecular e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de caprinos neonatos com diarreia. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 16, n. 4, p. 615-622, 2015.

HENTSCHEL, U; HACKER, J. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, n. 7, p. 545-548, June 2001.

GOOGLE maps. [Mapa do município de Xanxerê, Santa Catarina]. [S.l., 2018]. Disponível em: <<https://www.google.com/maps/@-26.8740553,-52.4154616,15z>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

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. **Epidemiological Review**, Oxford, v. 13, p. 60-98, 1991.

GUTH, B. E.C. *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 8, p. 1085-1089, 2002.

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

HARDEGEN C. *et al.* A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 9, p. 5, Jan. 2010. DOI:10.1186/1476-0711-9-5.

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

HINTON JR, A.; CASON, J. A.; INGRAM, K. D. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 155-165, Mar. 2004. DOI: 10.1016 / S0168-1605 (03) 00377-5. HU, J.; TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia Coli*: foe or innocent bystander? **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 21, n. 8, p. 729-734, Aug. 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TS 13136:2012(E)**: microbiology of food and animal feed: real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens: horizontal method for the detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. Geneva, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 17604:2015(E)**:

Microbiology of the food chain: carcass sampling for microbiological analysis. Geneva, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Brasil**: Santa Catarina: Xanxerê: população. [Brasília, DF], 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sc/xanxere/>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

IRINO, K. *et al.* O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 4, p. 446-447, Apr. 2002.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 4, n. 1, p. 80-128. Jan. 1991.

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

KAWANO, K. *et al.* Relationship between pathogenicity for humans and the stx genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 27, n. 3, p. 227-232, Mar. 2008.

KOBAYASHI, H.; POHJANVIRTA, T.; PELKONAN, S. Prevalence and characteristics of intimin- and shigatoxin producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 64, n. 11, p. 1071-1073, Nov. 2002.

LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 5, p.729-745, May 2000.

LEE, G. Y. *et al.* Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 3, p. 196-200, Sept. 2009.

LLOYD, A. L. *et al.* Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 191, n. 11, p. 3469-3481, June 2009.

LUBER, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs - which risks need to be managed first? International. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 1/2, p. 21-28. Aug. 2009. DOI: 10.1016 / j.ijfoodmicro.2009.02.012.

LUCATELLI, A. ***Escherichia coli* produtora de toxina Shiga em carne moída comercializada na cidade de São Paulo, SP**. 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

LUKÁSOVÁ, J.; ABRAHAM, B.; CUPÁKOVÁ, S. Occurrence of *Escherichia coli* O157 in raw material and food in Czech Republic. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, Berlin, v. 51, n. 2, p. 77-81, Mar. 2004.

- MAGALHÃES, P. O. *et al.* Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, Edmonton, v. 10, n. 3, p. 388-404, 2007.
- MANNING, S. D. What is *E. coli*? In: _____. **Escherichia coli infections**. 2nd ed. New York: Chelsea House Publishers, 2010. cap. 2, p. 16-25. (Deadly Diseases and Epidemics).
- MAO, Y.; DOYLE, M. P.; CHEN, J. Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 642-647, June 2006.
- MARKEY, B. *et al.* Enterobacteriaceae. In: _____. **Clinical veterinary microbiology**. 2nd ed. New York: Elsevier, 2013. cap.17, p. 239-274.
- MARTINEZ; M. B.; TADDEI, C. R. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. p. 293-301.
- MATHUSA, E. C. *et al.* Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 73, n. 9, p. 1721-1736, Sept. 2010.
- MELO, S. K. **Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de lagoas do parque estadual do Rio Doce**. 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006.
- MENG, J. *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, DC: ASM Press, 2007. cap. 12, p. 249-269.
- MIRI, A. *et al.* Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/NM from hamburger and chicken nugget. **International Journal of Environmental Health Engineering**, Isfahan, v. 3, n. 1, p. 20, 2014.
- MONEY, P. A. F. *et al.* Cattle, weather and water: mapping *Escherichia coli* O157:H7 infections in humans in England and Scotland. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 2633-2644, Oct. 2010.
- MORENO-GARCIA, B. **Higiene e inspección de carnes**. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 2006. v. 1.
- MURRAY, P. R. *et al.* (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, Washington, DC, v. 11, n. 1, p. 142–201, Jan. 1998.
- NORTHCUTT, J. K. *et al.* Effect of commercial bird washers on broiler carcass microbiological characteristics. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v.12, n. 4, p. 435-438, Dec. 2003.
- OLIVEIRA, A. V. B. *et al.* Padrões microbiológicos da carne de frango de corte– referencial teórico. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 6, n. 3, p. 1-16, 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Meat consumption**. Paris, 2017. Disponível em: <<https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>> . Acesso em: 24 fev. 2018.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 36, n. 2, p. 598-602, Feb. 1998.

PILIPCINEC, E. *et al.* Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. **Folia Microbiology**, Praha, n. 44, n. 4, p. 455-45, 1999.

POTTER, A. A. *et al.* Decreased shedding of *Escherichia coli* O157 :H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. **Vaccine**, Amsterdam, v. 22, n. 3/4, p. 362-369, Jan. 2004.

POWELL, C. *et al.* Microbiological comparison of inspection-passed and reprocessed broiler carcasses. **Journal Applied Poultry Research**, Oxford, v.4, n. 1, p. 23-31, Spring 1995.

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RANGEL, J. M. *et al.* Epidemiology of *Escherichia Coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 4, p. 603-609, Apr. 2005.

REIS, R. S. **Abordagem proteômica da interação bactéria-hospedeiro na colibacilose aviária**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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

RILEY, L. W. *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 308, n. 12, p. 681-685, Mar. 1983. DOI: 10.1056/NEJM1983032430 81203

SADDY, B. S. **Investigação de marcadores genéticos em amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* (UPEC)**. 2008. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina)-Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <[http://www4.unirio.br/dmp/Graduacao/TCC/Documentos/TCCs/\(2008-11\)%20TCC%20Beatriz%20Spinola.pdf](http://www4.unirio.br/dmp/Graduacao/TCC/Documentos/TCCs/(2008-11)%20TCC%20Beatriz%20Spinola.pdf)>. Acesso em: 2 mar. 2018.

SAITOH, T. *et al.* Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington , DC, v. 190, n. 14, p. 4822-4830, July, 2008.

SANDRINI, C. N. M. *et al.* *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 175-82, 2007.

SAVIOLLI, J. Y. **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da costa do Estado de São Paulo.** 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SCHMID-HEMPEL, P.; FRANK, S. A. Pathogenesis, virulence, and infective dose. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 3, n. 10, p. 1372-1373, 2007.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 1, Jan. 2011.

SIGNORINI, M. L.; TARABLA, H. Interventions to reduce verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef in Argentina: a simulation study. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 94, n. 1/2 p. 36-42, Apr. 2010.

SILVA I. M. *et al.* Genotypically characterization of *Escherichia coli* isolates from poultry **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 2, p. 333-339, Apr. 2011.

SILVA, N. *et al.* Preparação de amostras para análise. *In:* _____. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. cap. 2, p. 31-50.
SOFOS, J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, Oxford, v. 78, n. 1/2, p. 3-13, Jan. 2008.

SOUZA, T. B. *et al.* Real-time multiplex PCR assay and melting curve analysis for identifying diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 51, n. 3, p. 1031-1033, Mar. 2013.

STRACHAN, N. J. *et al.* 2006. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogens? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 112, n. 2, p. 129-137, Nov. 2006.

SVOBODOVÁ, I. *et al.* Microbiological quality of broiler carcasses during slaughter processing. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 81, v. 1, p. 37-42, 2012.

THRUSFIELD, M. V. Surveys. *In:* _____. **Veterinary epidemiology.** Hoboken: Butterworth, 1986. cap.14, p.153-159.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOZZI, A. E. *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia Coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 1, p. 106-108, Jan. 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

UNITED STATES OF AMERICA. United States Department of Agriculture. **Livestock and poultry**: world markets and trade. April 2016. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2018.

VELUZ; G. A.; PITCHIAH, S.; ALVARADO, C. Z. Attachment of Salmonella serovars and Listeria monocytogenes to stainless steel and plastic conveyor belts. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, p. 8, p. 2004-2010, Aug. 2012. 10.3382/ps.2011-01689.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu: 2005. 2 v.

VIDAL, M. *et al.* Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 43, n. 10, p. 5362-5365, Oct. 2005.

VISCARDI, M. *et al.* Isolation and characterisation of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* (EHEC and EPEC). **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 152-157, Feb. 2008.

VON RUCKERT, D. A. S. *et al.* Pontos críticos de controle de Salmonella spp. no abate de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 2, p. 326-330, abr. 2009.

WANI, S. A. *et al.* Investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in avian species in India. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 389-394, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC)**: report of a WHO scientific working group meeting. Geneva, 23-25 June 1998. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68880/WHO_CSR_APH_98.8.pdf;jsessionid=05F02E810108F5ADED718CD4B7481BED?sequence=1>. Acesso em: 5 mar. 2018.

WHITTAKER, P. J. *et al.* A national outbreak of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with consumption of lemon-and-coriander chicken wraps from a supermarket chain. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 137, n. 3, p. 375-382, Mar. 2009.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 11-19, Aug. 2008.

YOUNIS, G. A. *et al.* Virulence and extended-spectrum β -lactamase encoding genes in *escherichia coli* recovered from chicken meat intended for hospitalized human consumption. **Veterinary World**, Rajkot, v. 10, n. 10, p. 1281-1285, Oct. 2017.