

Ocorrência de *Escherichia coli* em suínos abatidos nos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina utilizando diferentes metodologias de isolamento

Occurrence of *Escherichia coli* in pigs slaughtered in the states of Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná and Santa Catarina using different methodologies of isolation

Robson M. Franco*, Samira P. S. Mantilla, Raquel Gouvêa, Luiz A. T. de Oliveira

Universidade Federal Fluminense

Resumo: No mundo inteiro, ultimamente tem ocorrido surtos de doenças transmissíveis por alimentos tendo como agente etiológico cepas de *Escherichia coli*, colocando em alerta o serviço de vigilância sanitária de alimentos e a comunidade científica, havendo necessidade de suporte para inspeção sanitária de métodos de análises bacteriológicas em produtos de origem animal, para diagnóstico completo e definitivo. A pesquisa teve como objetivo enumerar, isolar e identificar sorogrupos de *E. coli* em 100 amostras de suínos abatidos em matadouro mediante aplicação de quatro metodologias diferentes. Entre os tipos de amostras comestíveis analisadas, aquelas que apresentaram menor e maior enumeração de *E. coli* foram as da cavidade torácica e as da cavidade pélvica respectivamente. O método que possibilitou o isolamento de maior número de colônias foi o de Mehlman e Lovett (1984) modificado. Foram isolados sorogrupos EPEC, EIEC e EHEC. A reação de polimerase em cadeia demonstrou a presença de estirpe O157:H-. A presença dos sorogrupos de *E. coli* nas amostras comestíveis, ressalta a necessidade de se colocar em prática o sistema nacional e internacional da inocuidade de produtos de origem animal, para que a carne suína não seja veiculadora de enfermidades transmissíveis por alimentos, tendo como agente etiológico sorogrupos patogênicos ou oportunistas de *E. coli*, e que através de dejetos industriais, não tratados, estas cepas, inclusive O157:H-, não seja inserida na cadeia alimentar.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, comparação de métodos, carne suína

Summary: Recently, throughout the world, there have been outbreaks of diseases transmissible through food, whose etiological agents are variants of *E. coli*, putting food safety services and the scientific community on alert, with the consequent need to support the sanitary inspection services with methods of bacteriological analysis of products of animal

origin, for complete and definitive diagnosis. This study aimed to enumerate, isolate and identify serum groups of *E. coli* in 100 samples of swine collected in slaughterhouse through application of four different methodologies. Among the types of samples analyzed, those that had lower and higher enumeration of *E. coli* were the thoracic cavity and pelvic cavity respectively. The method which allowed the isolation of the highest number of colonies was that of Mehlman and Lovett (1984) modified. The serum groups EPEC, EIEC and EHEC were isolated. The polymerase chain reaction technique showed the presence of variant O157:H-. The presence of serum groups of *E. coli* in the samples highlights the need to put into practice the national and international system of safety of products of animal origin, so that pork will not be a source of illness caused by etiological agents such as pathogen or opportunistic *E. coli*, and that through non-treated industrial waste these variants, including O157:H-, do not contaminate the food chain.

Keywords: *Escherichia coli*, comparative methods, pork meat

Introdução

A carne suína pode sofrer contaminações e possíveis alterações bacterianas em função de fatores intrínsecos e extrínsecos tais como: sanidade animal, criação zootécnica (raça, tipo de manejo, alimentação, prevenção de doenças pelo uso adequado de vacinas); pH, potencial de oxidação-redução e umidade da própria carne. Estes fatores podem determinar contaminações cruzadas, resultando em carnes com elevada carga bacteriana e possível contaminação de origem fecal, onde a *Escherichia coli* se destaca no cenário nacional e internacional como um microrganismo de importância em sanidade animal, higiênico-sanitária e saúde coletiva.

A espécie bacteriana denominada *Escherichia coli* é um bastonete Gram negativo, não esporulado, oxidase negativa, móvel por flagelos peritríquios ou não móvel, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a

*Correspondência: robsonmf@vm.uff.br
Tel: + 55 (21) 2629 9045

glicose e a lactose com produção de ácidos e gases, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Acha e Szyfres, 2001).

Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas, epidemiologia e sorotipagem, as estirpes de *E. coli* consideradas patogênicas são agrupadas em cinco classes: EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica) e EAaggEC (*E. coli* enteroagregativa), sendo que a *E. coli* patogênica pode ser diferenciada das variedades não patogênicas através da imunologia e de outros métodos incluindo a sorotipagem essencial para os estudos epidemiológicos (Trabulsi e Toledo, 1989).

No Brasil, EPEC é responsável por cerca de 30% dos casos de diarreia aguda em crianças pobres com idade inferior a seis meses, com predominância dos sorotipos O111:[H-], O111:[H2], O119:H6 e O55:H6. As bactérias pertencentes ao grupo ETEC são importantes causas de diarreia. A doença atinge pessoas de todas as faixas etárias, sendo considerados um dos principais agentes etiológicos da chamada "diarreia dos viajantes", acometendo indivíduos que se locomovem de áreas desenvolvidas para regiões com problemas de saneamento básico (Franco e Landgraf, 2008).

A *Escherichia coli* sorotipo O157:H7, tida como uma bactéria emergente, causa um quadro agudo de colite hemorrágica, através da produção de grande quantidade de toxina, provocando severo dano à mucosa intestinal. O quadro clínico é caracterizado por cólicas abdominais intensas e diarreia, inicialmente líquida, mas que se torna hemorrágica na maioria dos pacientes. A doença é auto-limitada, com duração de 5 a 10 dias. Aproximadamente 15% das infecções por *E. coli* O157:H7, especialmente em crianças menores de cinco anos e idosos, podem apresentar uma complicação chamada Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), caracterizada por destruição das células vermelhas do sangue e falência renal que pode ser acompanhada de deterioração neurológica e insuficiência renal crônica (Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2009).

As técnicas convencionais de cultivo compreendem a fase de recuperação da célula danificada, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo e técnica sorológica para a detecção específica de *Escherichia coli* produtora de diarreia (diarreio gênica). Inúmeros meios líquidos são usados para enriquecimento seletivo de *Escherichia coli*. Os mais comumente usados são caldo EC e caldo Lauril sulfato; que possuem agentes seletivos como verde brilhante e bile, e Lauril sulfato de sódio respectivamente (Merck, 1994). Usa-se ainda caldo MacConkey e caldo GN (Varnam e Evans, 1996).

O sorotipo O157:H7 possui características fenotípicas que são utilizadas no desenvolvimento de meios

seletivos para seu isolamento. MacConkey-sorbitol ágar foi desenvolvido para isolamento e identificação presuntiva deste sorotipo incapaz de fermentar o sorbitol em 24 horas (CDC, 2000).

A Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) é um método rápido, sensível e específico, freqüentemente usado para determinar a presença de patógenos em humanos, bovinos e alimentos. Recentemente, numerosos grupos têm desenvolvido protocolos PCR multiplex usando dois ou mais pares de "primer" para aumentar a especificidade para identificação de *Escherichia coli* O157:H7, mantendo sua habilidade em detectar outros sorotipos (Franco & Landgraf, 1996; Gomes *et al.*, 1999). De acordo com Kawasaki *et al.* (2009), a PCR é um método valioso de avaliação rápida para a detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos, incluindo produtos cárneos.

Após a reflexão da importância que a *E. coli* vem ocupando na higiene de produtos de origem animal, na análise de perigos e pontos críticos de controle e no controle de qualidade bacteriológica desses produtos, foi desenvolvida pesquisa com objetivo de avaliar a ocorrência de *Escherichia coli* em 100 amostras de suínos abatidos em matadouros e isolar e identificar sorogrupos de *E. coli*, mediante aplicação de quatro metodologias diferentes: método 1 - Enumeração de coliformes, onde utilizou-se a metodologia descrita por Hitchins *et al.* (1995) e Kornacki e Johnson (2001); método 2 - Método Simplate™ para coliformes totais e *Escherichia coli*, o qual seguiu as recomendações descritas por Townsend *et al.* (1996); método 3 - Isolamento e diferenciação de estirpes enterohemorrágicas (EHEC) e *Escherichia coli* O157:H7, onde utilizou-se a metodologia preconizada pela Merck (1996); método 4 - Pesquisa de colônias de *Escherichia coli* enteropatogênica que utilizou-se a metodologia descrita por Mehlman e Lovett (1984) com algumas modificações.

Material e métodos

Foram analisadas, após a divisão de 20 animais em meias carcaças, 100 amostras de carne suína, sendo 20 amostras da região interna da papada (correspondente à área de ferida de sangria), 20 de pleura e músculos intercostais (cavidade torácica entre 4ª e 7ª costelas), 20 da cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda), 20 de linfonodos mesentéricos e 20 de fezes da região íleo-ceco-cólica de suínos escolhidos aleatoriamente, abatidos em abatedouro frigorífico, sob a Inspeção Estadual, clinicamente saudáveis e julgados aptos para o consumo após inspeção "ante e post - mortem", e provenientes dos estados do Rio de Janeiro (Magé e Rio Bonito), Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. Sendo que os linfonodos mesentéricos e fezes que foram obtidas antes da divisão, em bolsas plásticas para "stomacher" esterilizadas. Dos dife-

rentes pontos de obtenção das amostras, somente foram semeadas subamostras da parte carnosa, pois a parte gordurosa sempre foi retirada assepticamente, através de bisturis e lâminas esterilizadas e descartáveis. No caso dos linfonodos houve a total separação do "epíplon" e gordura.

As amostras foram, então, identificadas, numeradas e transportadas sob refrigeração (em caixa isotérmica sob ação indireta do gelo) ao laboratório onde foram mantidas congeladas a -18 °C, em conformidade com o armazenamento das carnes suínas, até o momento em que foram descongeladas "over night", em geladeira, a 2 °C para serem analisadas bacteriologicamente.

Foram utilizados quatro métodos, no método 1 (enumeração de coliformes) utilizou-se a metodologia descrita por Hitchins *et al.* (1995) e Kornacki e Johnson (2001). Esta metodologia foi usada nas amostras de carne da região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria, da cavidade torácica entre 4ª e 7ª costelas, e da cavidade pélvica por estar em concordância com o protocolo dos padrões microbiológicos de identidade e qualidade vigentes (Brasil, 2001). Essa metodologia é dividida em teste presuntivo onde 25 gramas da amostra foram homogeneizadas com 225 mL de Solução Fosfatada Tamponada (SFT) de Butterfield e realizaram-se as diluições e o Caldo Lauril Sulfato (CLS), teste confirmativo onde o subcultivo de cada tubo positivo de CLS foi transferido para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile Lactose "VBBL" e tubos com Caldo EC contendo um tubo de Durham invertido. Analisou-se a produção de gás, registrando-se os tubos positivos de cada diluição a partir dos quais foi calculado o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes por grama da amostra, conforme Tabela 1. Posteriormente, realizou-se o teste completo onde usou-se o Ágar Eosina Azul de Metileno Lactose, de onde foram selecionadas colônias típicas e procedeu-se a bacterioscopia por imersão para verificar-se a presença de bastões Gram negativos. Foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: Ágar SIM, Ágar Tríplice Açúcar Ferro, Ágar Citrato de Simmons. Vermelho de metila, Voges Proskauer, oxidação e fermentação do sorbitol, oxidação e fermentação do manitol, oxidação e fermentação da celobiose, descarboxilação da l-ornitina, Ágar EPM, Ágar MILI. As colônias típicas foram estocadas em caldo Infusão Cérebro Coração com 20% de glicerol à temperatura de -20 °C, para em seguida serem sorotipadas. Para a soroglutinação em placa com anti-soros poli e monovalentes seguiu-se a metodologia descrita por Ewing (1986). A confirmação bioquímica dos isolados foi verificada pelo sistema API20 E utilizado conforme especificação do fabricante.

O método 2 (Método Simplate™ para coliformes totais e *Escherichia coli*) seguiu as recomendações

descritas por Townsend *et al.* (1996), sendo usada nas mesmas amostras de carne suína citadas para o método 1. A tampa da base da placa do Simplate foi removida em condições de esterilidade, sendo dois mililitros do homogeneizado vertidos na plataforma central da base da placa e imediatamente foram adicionados 10 mL do meio para coliformes totais e *Escherichia coli*. O conteúdo da placa (homogeneizado + meio) foi distribuído uniformemente pelas concavidades girando-se gentilmente a placa no sentido horário e anti-horário. Procedeu-se à incubação das placas invertidas por 24 horas à 37 °C. Após este período, as concavidades coloridas (do laranja ao vermelho) foram contadas e consideradas positivas para coliformes totais. Paralelamente, a placa foi exposta à radiação ultravioleta para contagem das concavidades fluorescentes consideradas positivas para *Escherichia coli*. As concavidades coloridas que não fluoresciam foram positivas para coliformes totais, porém negativas para *Escherichia coli*. O número de concavidades coloridas e o número de concavidades fluorescentes foi comparado com a tabela de NMP para obter-se o NMP de coliformes totais e *Escherichia coli*, respectivamente.

No método 3 (Isolamento e diferenciação de estirpes enterohemorrágicas (EHEC) e *Escherichia coli* O157:H7), utilizou-se a metodologia preconizada pela Merck (1996), sendo aplicado nas mesmas amostras de carne suína citadas para o método 1 e também nos linfonodos mesentéricos e fezes da região íleo-ceco-cólica. Para o preparo, 25 gramas de cada tipo de amostra que foram acondicionadas em bolsa "stomacher" e adicionadas de 225 mL de caldo Lauril Sulfato sendo homogeneizadas. O homogeneizado foi incubado por 24 horas à 37 °C e foram semeados 0,1 mL do subcultivo crescido no caldo, na superfície de Agar *Escherichia coli* O157:H7 fluorocult em placas. As colônias sorbitol negativas ou positivas foram analisadas mediante uma lâmpada Ultra Violeta com referência à formação de fluorescência. As colônias sorbitol negativas ou positivas, com ou sem fluorescência e isoladas, foram identificadas por biotipificação e testes sorológicos conforme descritos anteriormente.

Para o método 4 (Pesquisa de colônias de *Escherichia coli* enteropatogênica) utilizou-se a metodologia descrita por Mehlman e Lovett (1984) com algumas modificações, sendo analisada as mesmas amostras referidas no método 2. As amostras analisadas foram pesadas em 25 gramas e acondicionadas em bolsa "stomacher", adicionadas de 225 mL de Caldo Infusão Cérebro Coração. O homogeneizado foi transferido para um frasco Erlenmeyer de capacidade de 500 mL e incubado por três horas à 35 °C para a recuperação das células danificadas. Foi feita a semeadura direta em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno Lactose seg Levine, Ágar MacConkey Sorbitol, Ágar Telurito Cefixima Sorbitol

MacConkey, Ágar *Escherichia coli* O157:H7 Fluorocult e Ágar "Hemorrhagic colitis" isento de MUG. Sendo todos os meios incubados por 18 - 24 horas à 35 °C. Posteriormente foi feito um enriquecimento seletivo para isolar *Escherichia coli* enteropatogênica com o Caldo Triptona Fosfato com dupla concentração e incubados à 44 °C ± 0,2 °C por 20 horas. O subcultivo crescido no Caldo foi semeado nos mesmos meios utilizados na semeadura direta. Por fim foi realizada a biotipificação conforme anteriormente descrito.

A colônia sorotipada como EHEC foi testada para PCR, utilizando-se PCR multiplex para os genes "shiga toxin" *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* sendo PCR₁ segundo China *et al.* (1996) e PCR₂ segundo Paton e Paton (1998) no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), usando-se a amostra de *Escherichia coli* K-12DH5 ∞ como controle negativo e as amostras *Escherichia coli* E40705 (O157:H7, *stx*₁/*eaeA*) e *Escherichia coli* E30138 (O157:H7, *stx*₂/*eaeA*) como controles positivos, sendo estas oriundas da CPHL-UK.

Para a amplificação dos genes que codificam a subunidade A de *stx*₁, a subunidade A *stx*₂ (incluindo as variantes conhecidas de *stx*₂) e a região do gene que codifica *eaeA*, foram utilizados os "primers" descritos originalmente por China, Pirson e Mainil (1996). Estes "primers" foram originalmente denominados *stx*₁-F(5'AGA GCG ATG TTA CGG TTT G 3') e *stx*₁-R(5' TTG CCC CCA GAG TGG ATG 3'); *stx*₂-F(5' TGG GTT TTT CTT CGG TAT C3') e *stx*₂-R(5' GAC ATT CTG GAC TCT CTT 3') e EP₁(5' AGG CTT CGT CAC AGT TG 3') e EP₂(5' CCA TCG TCA CCA GAG GA 3') para *eaeA*. O produto da amplificação da seqüência *stx*₁ consiste em um fragmento de DNA com peso molecular de 388 pb, da seqüência *stx*₂ em fragmento de 807 pb da seqüência *eaeA* em fragmento de 570 pb. A análise dos fragmentos amplificados procedeu-se em eletroforese, em gel agarose a 1,8% por 50 minutos em 130v/130mA, com brometo de etídeo (5 mg/mL). Para aumentar a densidade do DNA, facilitar a dispersão das bandas e acompanhamento da corrida acrescentou-se o corante azul de bromofenol. Observaram-se os brancos em aparelho transluminador e fotografaram-se as bandas em câmara polaróide.

Resultados

Enumeração de coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* – métodos 1 e 2

Nas amostras da região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria para o método 1 a variação de coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* foi respectivamente < 2 UFC/g a

46 UFC/g, < 2 UFC/g a 33 UFC/g e de ausência a 33 UFC/g, sendo que cinco (25%) amostras, quatro (20%) amostras e quatro (20%) amostras estavam contaminadas por coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli*, respectivamente. Para fins estatísticos o NMP < 2 UFC/g foi considerado como zero, pelo fato de tal resultado oferecer a combinação de 0 – 0 – 0 na primeira, segunda e terceira séries, respectivamente, significando ausência de crescimento (Tabela 1). O NMP de coliformes fecais foi o mesmo de *Escherichia coli*, pois todos coliformes fecais foram identificados como *Escherichia coli*.

O NMP para o método 2 teve variação, respectiva, de coliformes totais e *Escherichia coli* de zero (ausência) a 28 UFC/g e de zero (ausência) a 18 UFC/g, nas amostras. Cinco (25%) amostras estavam contaminadas por coliformes totais e *Escherichia coli*.

As amostras da cavidade torácica entre 4^a e 7^a costelas apresentaram-se contaminadas por coliformes, as demais estavam isentas deste grupo. Em nenhuma das amostras foram encontrados coliformes fecais ou *Escherichia coli*. Para o método 2, duas (10%) amostras apresentaram-se contaminadas por coliformes totais (dois coliformes por amostra) e em nenhuma amostra foi detectada a presença de coliformes fecais ou *Escherichia coli*.

Pelo método 1, para as amostras da cavidade pélvica, os coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli*, variaram respectivamente de < 2 UFC/g a 1600 UFC/g, de < 2 UFC/g a 1600 UFC/g e de ausência a 1600 UFC/g, cujo percentual de contaminação ocorreu em 14 (70%) amostras para os respectivos microrganismos. O NMP dos coliformes fecais foi o mesmo de *Escherichia coli* e todos os coliformes fecais foram identificados como *Escherichia coli*. Considerando-se o método 2, o NMP para coliformes totais e *Escherichia coli*, variou de zero a 276 UFC/g, e de zero a 195 UFC/g, respectivamente; sendo que em treze (65%) amostras foram encontrados os microrganismos em questão.

Isolamento e diferenciação de estirpes enterohemorrágicas (EHEC) e *Escherichia coli* O157:H7 – método 3

O número de colônias suspeitas de *Escherichia coli* nas diferentes amostras pelo método 3, foram as seguintes: na região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria 18 (sendo nenhuma EHEC e nem EPEC), na cavidade torácica entre 4^a e 7^a costelas 20 (sendo nenhuma EHEC e nem EPEC); na cavidade pélvica 24 (sendo nenhuma EHEC e nem EPEC); nos linfonodos mesentéricos 36 sendo 1 EPEC e nas fezes 48 sendo 1 EHEC, deixando claro que dentre os tipos de amostras que são usadas para consumo, àquelas oriundas da cavidade pélvica apresentaram maior número de colônias confirmadas,

Tabela 1- Tabela de Mac Crady utilizada para a determinação do número mais provável

Número de Tubos Positivos			NMP/g ou mL	Intervalo Confiança (95%)	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<3,0	-,-	9,5
0	0	1	3,0	0,15	9,6
0	1	0	3,0	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1000
3	3	0	240	42	1000
3	3	1	460	90	2000
3	3	2	1100	180	4100
3	3	3	>1100	420	-,-

Fonte: Brasil, 2003

Tabela 2 - Eficiência dos diferentes tipos de meios empregados no método 4 (semeadura direta e enriquecimento) nos diferentes tipos de amostras, para isolamento de *E. coli*

Tipo de amostra	Tipo de semeadura	EMB	Mac Lac	Mac Sorb	TC-Smac	O157:H7	HC35°C	HC44,5°C	Total (colônias)
A	Direta	6	4	2	0	0	4	4	20
	Enriquecimento	28	26	16	2	11	7	11	101
B	Direta	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enriquecimento	30	24	20	6	22	30	21	153
C	Direta	10	6	0	0	0	0	0	16
	Enriquecimento	22	48	34	10	57	28	39	238
D	Direta	12	6	11	0	0	6	6	41
	Enriquecimento	33	42	42	0	48	27	30	222
E	Direta	18	24	12	0	12	24	12	102
	Enriquecimento	30	42	36	6	36	42	36	228
Total		189	222	173	24	186	168	159	1121

Meio de cultura	Desvio padrão	Mediana	Média *
EMB	4,09	30	26,6 a
Mac Lac	10,71	42	36,4 a
Mac Sorb	11,08	34	29,6 a
TC-Smac	3,89	6	4,8 b,c
O157:H7	18,70	36	34,8 a,c
HC 35 °C	12,59	28	26,8 a
HC 44,5 °C	11,45	30	27,8 a

* Letras iguais: não há diferenças; e letras diferentes; têm diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$)

Sendo:

A- Região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria

B- Cavidade torácica entre 4ª e 7ª costelas (pleura e músculos intercostais)

C- Cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda)

D- Linfonodos mesentéricos (região ileo-ceco-cólica)

E- Fezes (região ileo-ceco-cólica)

porém, nenhuma delas pertence às categorias EPEC ou EHEC.

Pesquisa de *Escherichia coli* enteropatogênica (Mehlman e Lovet, 1984c) modificado – método 4

Encontra-se na Tabela 2 o número de colônias de *Escherichia coli* confirmadas por tipo de amostra no método acima mencionado, onde o número de colônias isoladas por enriquecimento sempre foi superior ao número de colônias isoladas por plaqueamento direto.

O meio Ágar *Escherichia coli* O157:H7 e Meio MacConkey sorbitol apresentaram número maior e igual de sorogrupos identificados entre os meios de plaqueamento testados. Pela análise de variância os dados não apresentaram diferença significativa entre si.

Na Tabela 3 é encontrado o número de colônias suspeitas e confirmadas pelos métodos um, três e quatro onde no método 4 sempre houve maior número de colônias suspeitas e confirmadas pela semeadura, após enriquecimento, do que pela semeadura direta, sendo que das 1584 colônias suspeitas, 59,47%

(942/1584) foram confirmadas.

Pela análise estatística houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tipos de métodos utilizados no isolamento e identificação de *Escherichia coli*. Tais diferenças entre os métodos pelo teste de Tukey-Kramer, ocorreram entre Met1cT X Met4B, Met1cF X Met4B, Met3 X Met4B. Considerando-se que entre os métodos testados, o método 4 foi o que apresentou o maior número de colônias confirmadas.

Na Tabela 4 é encontrado o número de colônias isoladas em cada um dos meios de plaqueamento seletivo quer seja por plaqueamento direto quer por enriquecimento em cada tipo de amostra pesquisada. Pela análise de variância houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a semeadura direta e enriquecimento independentemente do tipo de meio de plaqueamento usado. Não ocorreu diferença estatística significativa entre os tipos de meios usados nas semeaduras entre os diferentes tipos de amostras analisadas. Isto possivelmente, foi prejudicado pela grande quantidade de zeros (resultados negativos).

Pelo método de Tukey-Kramer houve diferença ($P < 0,05$) entre: EMB e TC-SMAC, MAC-LAC e TC-SMAC, MAC SORB e TC-SMAC, TC-SMAC e O157:H7.

Utilizou-se PCR em apenas um isolamento identifi-

Tabela 3 - Ocorrência de colônias H2S (+) e de sorogrupos de *Escherichia coli* identificados nos diferentes métodos analíticos bacteriológicos aplicados

Método	Total de colônias	Colônias H2S (+)	Colônias (+) nos T.B.	Sorologia			Total
				EPEC	EIEC	EHEC	
Mét.1 CT	66	39	27	0	0	0	0
Mét.1 CF	78	17	61	0	0	0	0
Mét.2*	0	0	0	0	0	0	0
Mét.3	264	118	146	1	0	1	2
Mét.4A	306	121	185	2	1	0	3
Mét.4B	1584	642	942	9	3	0	12
	2298	937	1361	12	4	1	17

* Mét2 foi excluído da análise estatística por diferença discrepante dos demais, por apresentar valores iguais a zero.

Método	Desvio padrão	Mediana	Média * *
Mét.1 CT	27,39	33	33,00 a
Mét.1 CF	36,56	39	39,00 a
Mét.3	107,57	132	132,50 a
Mét.4A	126,43	153	153,75 a,b
Mét.4B	653,36	792	795,00 b

* * Letras iguais; não há diferenças; e letras diferentes: têm diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Eficiência dos diferentes tipos de meios empregados no método 4 (semeadura direta e enriquecimento) nos diferentes tipos de amostras, para isolamento de *E. coli*.

Tipo de amostra	Tipo de semeadura	EMB	Mac Lac	Mac Sorb	TC-Smac	O157:H7	HC35°C	HC44,5°C	Total (colônias)
A	Direta	6	4	2	0	0	4	4	20
	Enriquecimento	28	26	16	2	11	7	11	101
B	Direta	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enriquecimento	30	24	20	6	22	30	21	153
C	Direta	10	6	0	0	0	0	0	16
	Enriquecimento	22	48	34	10	57	28	39	238
D	Direta	12	6	11	0	0	6	6	41
	Enriquecimento	33	42	42	0	48	27	30	222
E	Direta	18	24	12	0	12	24	12	102
	Enriquecimento	30	42	36	6	36	42	36	228
Total		189	22	17	24	186	168	159	1121

Meio de cultura	Desvio padrão	Mediana	Média *
EMB	4,09	30	26,6 a
Mac Lac	10,71	42	36,4 a
Mac Sorb	11,08	34	29,6 a
TC-Smac	3,89	6	4,8 b,c
O157:H7	18,70	36	34,8 a,c
HC 35°C	12,59	28	26,8 a
HC 44,5°C	11,45	30	27,8 a

* Letras iguais; não há diferenças; e letras diferentes: têm diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

cado sorologicamente como EHEC-O157, pois apesar do mesmo apresentar-se como sorbitol positivo e MUG positivo, comportou-se negativamente frente aos sorogrupos pertencentes às categorias (EPEC A, EPEC B, EPEC C, EIEC A e EIEC B). A sorologia positiva foi também confirmada em testagem no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sendo em seguida corroborada com a identificação de cepa O157:H- por PCR nesta mesma Universidade.

Discussão

A ocorrência das categorias de *Escherichia coli* foi relativamente baixa, sendo este resultado similar aos encontrados por outros pesquisadores ao estudarem *Escherichia coli* em produtos cárneos. Reis *et al.* (1980) encontraram *Escherichia coli* patogênica em 5%, 7,5% e 10% de amostras de quibe, hambúrguer e salsicha, respectivamente. Franco *et al.* (1991) encontraram baixíssima frequência do sorogrupo O15 em carne crua bovina das 306 colônias testadas.

Lenahan *et al.* (2008), coletou amostras fecais de suínos e amostras de suabes de carcaça em quatro matadouros de suínos irlandês objetivando analisaram a presença de *E. coli* O157: H7 essa não foi encontrada nos suabes das carcaças. Entretanto, San Juan *et al.* (2007) ao determinarem as condições microbiológicas durante o processo de abate de um matadouro municipal do México, verificou que das 158 amostras analisadas, coliformes totais e *E. coli* foram detectados na maioria das amostras, sendo mais abundante na linha de abate de suíno que do bovino.

Nesta pesquisa, nas amostras comestíveis analisadas pelos métodos 1 e 2, que foram positivas, o NMP de coliformes totais foi na maioria das vezes superior ao de *Escherichia coli* concordando com pesquisa desenvolvida por Laubach *et al.* (1998) em carne de cabeça de suíno.

No presente trabalho, para as amostras da região interna da papada correspondentes à área de ferida de sangria os achados estabelecem que houve correspondência entre ausência e presença de coliformes e *Escherichia coli*, entre as amostras, pelos métodos empregados, entretanto, em 95% dos casos, no método 1, o NMP de coliformes e *Escherichia coli* foi superior ao do método 2, embora o método 2 não caracterizasse a presença de coliformes fecais. A Resolução RDC nº 12 (Brasil, 2001) não estabelece padrões qualitativos ou quantitativos para quaisquer tipos de coliformes entre as amostras comestíveis investigadas, recomendando que, caso seja determinada a presença de *Escherichia coli*, deve constar no laudo analítico.

Geralmente, as carnes oriundas da ferida de sangria são usadas para a produção de embutidos, entretanto, em muitos casos são usadas para consumo humano "in natura", que sugere o procedimento analítico destas amostras. Matsubara (2005) avaliou as condições higiênico-sanitárias de 240 meias-carcaças de suínos realizando a contagem de coliformes totais e de *Escherichia coli* em três regiões pré-definidas (face lateral externa do pernil, do peito e da papada) e verificou-se coliformes totais em 98,7% e *Escherichia coli* em 90,7% das meias-carcaças analisadas. A partir de seus dados estatísticos, observaram-se que não houve diferença entre a contaminação de coliformes totais nas diferentes regiões analisada, porém, houve diferença para a contagem de *E. coli*, sendo mais elevada na papada, no pernil e por último, no peito.

Os métodos 3 e 4 de enriquecimento das amostras a serem pesquisadas quanto a presença de *Escherichia coli* foram comparados entre si. No método 3 ocorreu maior recuperação e confirmação de isolados de *Escherichia coli* que no método 4 por semeadura direta; porém, no método 4, com enriquecimento, independentemente do meio usado e temperatura de incubação, o número de isolados suspeitos e confirmados foi sempre maior. Nestes procedimentos analíticos o método 4 apresentou maior número

de colônias confirmadas em relação ao número de isolados triados, e o meio com maior percentual de recuperação foi MAC LAC (54,2%) confirmando, como indica a técnica original, que o uso do MAC LAC apresentou bons resultados para determinação de *Escherichia coli* em alimento, tal como ocorreu com as amostras em epígrafe.

Na aplicação dos métodos 3 e 4, o enriquecimento não seletivo das amostras tem como objetivo revitalizar as células danificadas objetivando melhor eficácia na determinação da microbiota em questão. Esta afirmação torna-se fundamentada, pois no método 3 e no método 4 com enriquecimento, ao ser comparado o número de colônias suspeitas e confirmadas nos meios de plaqueamento seletivo com o meio de plaqueamento no método 1 e na detecção pelo método 2, os números de colônias naqueles métodos são bem mais superiores que nestes. O método 4 por semeadura direta apresentou crescimento menor. Tais observações deixam claro que o enriquecimento teve importância na estimativa de um maior número de colônia suspeita e confirmada nos testes bioquímicos. Entre os métodos aplicados, observa-se que o enriquecimento não seletivo também foi fundamental na recuperação e confirmação de colônias típicas de *Escherichia coli*. Os meios MAC LAC e HC a 35 °C foram os mais apropriados por apresentarem maior número de colônias suspeitas e confirmadas bioquimicamente.

Comparando-se os tipos de amostras comestíveis pesquisadas entre si observa-se que independente do método aplicado, as amostras da cavidade pélvica apresentaram maiores valores bacteriológicos. As pesquisas nacionais não revelam estudo colimétrico em carnes de suíno na área anatômica em questão, contudo quando Gill *et al.* (1995) procederam estudo semelhante em carcaça bovina, embora com método de coleta diferenciado e meio similar, também sugeriram, como nossos achados, que esta área seja a mais contaminada entre as outras pesquisadas. Gill e Jones (1998) ao enumerarem *Escherichia coli* em carcaça suína pelo método de "zaragatoa" na região anatômica correlacionada com esta pesquisa sugeriram, também, contaminação elevada.

Os linfonodos podem conter microbiota muito intensa e diversificada. Nesta pesquisa conforme consta na Tabela 3, a suspeita e confirmação de *Escherichia coli* em linfonodos mesentéricos foram maiores, no total geral, considerando-se os métodos 3 e 4 aplicados aos demais tipos de amostras cárneas analisadas, mostrando que este órgão pode ser um veiculador de microbiota para os diferentes nichos ecológicos, quando do rompimento de sua cápsula durante as fases de processamento tecnológico de abate.

Apesar da utilização do MUG seja atualmente muito divulgada não foram encontrados trabalhos determinando a presença de *Escherichia coli* por

fluorescência, em meios de plaqueamento, em amostras originárias de suínos. Foi observado neste experimento que o meio ágar *Escherichia coli* O157:H7 em cuja composição, possui o MUG, quando comparado com os meios tradicionalmente utilizados como ágar EMB, ágar MacConkey lactose, ágar MacConkey sorbitol, não ocorreu diferença estatística significativa. Estes resultados vão em desconformidade com os descritos por Venkateswaran *et al.* (1996) onde afirmam que o MUG adicionado ao meio ágar bile vermelho violeta, tornou-o duas vezes mais eficaz que o ágar EMB para isolar *Escherichia coli* em produtos cárneos, muito embora o meio ágar *Escherichia coli* O157:H7 não tenha a mesma composição básica que o ágar bile vermelho violeta.

Ao aplicar-se o método sorológico em paralelo com aplicação da PCR, muitas das vezes os resultados podem ser conflitantes, pois a reação cruzada ou divergente pode existir, tal proposição é colocada em discussão por Aleksic *et al.* (1992) que ao pesquisarem o esquema de biotipificação para *Escherichia coli* O157:H7 concluíram que dez (25,6%) das estirpes de *Escherichia coli* produtoras de SLT foram sorbitol positivas e não reconhecidas em placas MacConkey sorbitol e relatam que as duas estirpes sorotipadas com O157 foram sorbitol e glucuronidase positivas não foram produtoras de SLT. Estas afirmações apresentam paralelismo à amostra aqui isolada como EHEC-O157:H-, em resultados, pelo fato de que o sorogrupo apresentou, no meio de plaqueamento ágar *Escherichia coli* O157:H7 colônias esverdeadas não se caracterizando como sorbitol positivas, porém foram diagnosticadas como positivas, para este carboidrato, nas provas bioquímicas e comportaram-se com glucuronidase positivas, sem produzir SLT no estudo de PCR.

Conclusões

As amostras de carne suína oriundas da área de ferida de sangria que apresentaram contaminação por coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* quando analisadas pelos métodos 1 ou 2 devem ser consideradas impróprias para o consumo ou para uso industrial, entretanto a Resolução RDC nº12 (Brasil, 2001) não estabelece padrões para o germe em questão. Todas as amostras de pleura e músculos intercostais que apresentaram ausência de coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* pela prova analítica do método 1, devem ser consideradas próprias para processamento ou consumo; entretanto aquelas em que o método 2 revelou a presença de coliformes totais e ausência de *Escherichia coli*, devem ser consideradas impróprias para o consumo ou uso industrial. As amostras da região sub-sacral próxima à base da cauda que possuíam coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli*, quer seja pelo método 1 e 2,

devem ser consideradas processadas em condições inadequadas na aplicação das Boas Práticas (origem da matéria prima, higiene e processamento) e não devem ser consumidas ou processadas industrialmente.

O método 3, ao ser aplicado nas diferentes amostras permitiu revelar a confirmação de EPEC e EHEC em amostra de linfonodos e fezes, respectivamente.

A fase de enriquecimento no método 4, independentemente do tipo de amostra analisada permitiu uma recuperação significativamente maior de colônias de *Escherichia coli*, sendo o meio Mac Lac seguido do EMB os que apresentaram maiores números de colônias isoladas. Esta fase ainda permitiu uma recuperação significativamente maior de colônias de EPEC, EIEC, e na detecção de amostras comestíveis e não comestíveis contaminadas por grupos de *Escherichia coli*.

As amostras de pleura e músculos intercostais analisadas não apresentaram nenhuma cepa EPEC, EIEC ou EHEC, sendo portanto consideradas em condições próprias de consumo.

O meio ágar *Escherichia coli* O157:H7 apesar de ser indicado para isolamento e diferenciação de estirpes enterohemorrágicas (EHEC) e *Escherichia coli* O157:H7, conforme ocorreu o isolamento da cepa O157:H- na amostra de fezes pelo método 3, ainda ofereceu condições próprias para o isolamento de estirpes EPEC em amostra de linfonodos mesentéricos.

A cepa sorotipada como EHEC O157 foi confirmada como O157:H- em PCR.

A presença de *Escherichia coli* em alimentos e *Escherichia coli* O157:H-, O157:H7, ressalta a necessidade de se colocar em prática o sistema nacional e internacional de inocuidade dos alimentos objetivando eliminar do abastecimento os alimentos para o consumo humano e os animais enfermos ou portadores assintomáticos, cuja carne possa transmitir enfermidades aos comensais.

Bibliografia

- Acha PN e Szyfres B (2001). Zoonosis e enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Bacterioses y micosis. Publicacion Científica y Técnica nº 580. 3ª ed. v.I Ed: Organization Panamericana de La Salud (OPS). Washington – DC – 20037 – EUA, 398.
- Aleksic S, Karch H, Bockemühl J (1992). A biotyping scheme for shiga-like (Vero) toxin-producing *Escherichia coli* O157 and a list of serological cross-reactions between O157 and other Gram-negative bacteria. *Journal of Medical Microbiology Virology Parasitology Infective Disease*, 276: 221-230.
- Brasil (2001). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília,

- DF, n.7-E, p. 45-53, de 10 de Janeiro de 2001. Seção 1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União de 18/09/2003, Seção 1, Página 14.
- CDC. Centers For Disease Control And Prevention (2000). Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Disease Information. *Escherichia coli* O157:H7 [on line]. 2000. Disponível: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli-g.htm>. Acesso em 07 de setembro de 2008.
- China B, Pirson V, Mainil J (1996). Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex *in vitro* amplification of virulence-associated genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9): 3462-3465.
- Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Centro de Vigilância Epidemiológica/CVE/SES-SP. (2009). Manual das doenças transmitidas por alimentos e água - *Escherichia coli* O157:H7 - enterohemorrágica (EHEC). Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Ecolinet.htm>. Acesso em 4 de agosto de 2009.
- Doyle MP e Padyhe VV (1989). *Escherichia coli*. In: Foodborne Bacterial Pathogens, Doyle, M.P. Ed. Marcel Dekker: New York and Basel.
- Franco BDGM e Landgraf M (1996). Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu. 182 p., 2008.
- Franco BDGM, Gomes TAT, Jakabi M, Marques LRM (1991). Use of probes to detect virulence factor DNA sequences in *Escherichia coli* strains isolated from foods. *International Journal Food Microbiology*, 12: 333-338.
- Gill CO e Jones T (1998). Comparison of methods for sampling and enumeration *Escherichia coli* on pig carcasses. *Food Microbiology*, 15(6), 617-623.
- Gill CO, Mcginnis JC, Badoni M (1995). Assessment of the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. *Journal of Food Protection*, 59(2): 136-140.
- Hitchins AD, Feng P, Watkins WD, Rippey SR, Chandler LA (1998). *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. 1995 (Revision A / 1998). Arlington, Cap 4: 401-406.
- Kawasaki S, Fratamico PM, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, Kawamoto S (2009). Evaluation of a Multiplex PCR System for Simultaneous Detection of Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and *Escherichia coli* O157:H7 in Foods and in Food Subjected to Freezing. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 (1): 81-89.
- Kornacki JL e Johnson JL (2001). Enterobacteriaceae. Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicator In: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Washington. APHA, 676 p. Cap. 8: 69-82.
- Korsak N, Daube G, Ghafir Y, Chahed A, Jolly S, Vindevogel H (1998). An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. *Journal of Food Protection*, 61(5): 535-541.
- Laubach C, Rathgeber J, Oser A, Palumbo S (1998). Microbiology of the swine head meat deboning process. *Journal of Food Protection*, 61(2): 249-252.
- Lenahan M, Crowley H, O'Brien SB, Byrne C, Sweeney T, Sheridan JJ (2008). The potential use of chilling to control the growth of Enterobacteriaceae on porcine carcasses and the incidence of *E. coli* O157:H7 in pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5): 1512 – 1520.
- Matsubara EM (2005). Condição higiênico-sanitária de meias-carcaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise da utilização de Lista de Verificação para avaliar boas práticas no abate de suínos. 152 f. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.
- Mehlman IJ e Lovett J (1996). Enteropatógeno *Escherichia coli*. In: Bacteriological Analytical Manual 4th ed. Food and Drug Administration, Virginia, US: 6-11.
- Merck (1996). Microbiology Manual Cultura Media. Dormstadt, Germany: 405.
- Messer JW, Midura TF, Peeler JT (1992). Sampling plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3^o ed. American Public Health Association (APHA), Washington, Cap. 2: 25-49.
- Paton AW e Paton JC (1998). Detecção and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *stxA*, enterohemorrágica *Escherichia coli* hlyA, rfbO111 e rfb0157. *Journal Clinical Microbiology*, 36(2): 598-602.
- Reis MHL, Vasconcelos JC, Trabulsi LR (1980). Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 270-271.
- Sack RB, Sack DA, Mehlman IJ, Orskov F, Orskov I (1977). Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. *Journal Infect. Disease*, 135: 313.
- San Juan SH, Estrada AZ, Ortega IS, Rosas JC, Gutiérrez ADR, López SEM (2007). Condiciones microbiológicas en el proceso de sacrificio en un rastro municipal del estado de Hidalgo, México. *Vet. Méx.*, 38(2): 187-195.
- Trabulsi LR e Toledo MRF (1989). Resistência Bacteriana a Droga. In: Trabulsi L.R. Microbiologia. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 386p. cap.13: 86-89.
- Townsend DE, Irving R, Smith K, Naqui A (1996). A new test for the detection and quantification in the total coliform and *Escherichia coli* concentration in food. IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME. USA.
- Varnam AH, Evans MG (1996). Foodborne pathogens. An illustrated text. Marison Publishing, 501p.
- Venkateswaran K, Murakoshi A, Satake M (1996). Comparison of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 16: 2236-2243.