



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAOLA BIANCA BARBOSA CAVALIN

**PESQUISA DE *Salmonella* spp. E *Escherichia coli*
DIARREIOGÊNICAS EM LINGUIÇAS**

Londrina
2017

PAOLA BIANCA BARBOSA CAVALIN

**PESQUISA DE *Salmonella* spp. E *Escherichia coli*
DIARREIOGÊNICAS EM LINGUIÇAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tereza Cristina Rocha
Moreira de Oliveira.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B. Cavalin, Paola Bianca.

Pesquisa de Salmonella spp. e Escherichia coli Diarreio gênicas em Linguiças / Paola Bianca B. Cavalin. - Londrina, 2017.

60 f.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017. Inclui bibliografia.

1. carne suína - Tese. 2. bactérias enteropatogênicas - Tese. 3. genes de virulência - Tese. I. Rocha Moreira de Oliveira, Tereza Cristina . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

PAOLA BIANCA BARBOSA CAVALIN

**PESQUISA DE *Salmonella* spp. E *Escherichia coli*
DIARREIOGÊNICAS EM LINGUIÇAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tereza Cristina Rocha
Moreira de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Jane Martha Graton Mitcha
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof.^a Dr.^a Renata K. Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 17 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e a todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação. À nossa secretária de departamento, Sandra Rezende. Ao colega Juan Sarmiento pela colaboração com a parte experimental. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro e aos demais que direta ou indiretamente tenham participado na realização desse trabalho.

CAVALIN, Paola Bianca Barbosa. **Pesquisa de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* Diarreio gênicas em Linguiças.** 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A prevenção da contaminação por microrganismos patogênicos é um dos principais desafios enfrentados na produção de embutidos cárneos. O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína do mundo. O Paraná é segundo maior estado produtor de carne suína no país e foi responsável por 21,0% dos suínos abatidos e por 12,1% do total exportado em 2015. Pequenas indústrias da região de Londrina, Paraná, produzem embutidos que são comercializados em feiras livres, pequenos mercados, bares e restaurantes da cidade. Embora essas indústrias sejam fiscalizadas pela Vigilância Sanitária Municipal, não existem dados sobre microrganismos patogênicos presentes nesses produtos. O objetivo deste estudo foi pesquisar a presença de *Salmonella* spp. e *E. coli* diarreio gênicas em amostras de linguiças produzidas e comercializadas na região de Londrina, Paraná. Quarenta e seis amostras de três tipos de linguiça (suína, toscana e calabresa) produzidas por quatro diferentes produtores (A, B, C e D) foram analisadas. A pesquisa de *Salmonella* spp. e de *E. coli* foi realizada por técnica convencional de cultura. O ensaio PCR foi realizado para a detecção dos genes de virulência de *E. coli* diarreio gênicas (*eae*, *bfp*, *stx1*, *stx2*, *hlyA*, *ipaH*, *elt*, *aggR*, *aap* e *AA probe*). Das 46 amostras analisadas, 12 (26,1%) estavam contaminadas com *Salmonella* spp. e 33 (71,3%) com *E. coli*. A marca A apresentou o maior número de amostras contaminadas com *Salmonella* spp. (58,3%) e *E. coli* (88,9%). Percentagem alta de contaminação por *E. coli* também foi observada nas linguiças suína e toscana da marca B (12 de 15 / 80,0%). A contaminação por *Salmonella* spp. foi maior nas amostras de linguiça toscana (8 de 17 / 41,7%), quando comparada com a contaminação encontrada nas amostras de linguiça suína (4 de 22 / 18,2%), independente da marca analisada. O número de amostras das marcas C (n=5) e D (n=5) foi muito menor que os das marcas A (n=18) e B (n=18). *E. coli* e *Salmonella* spp., no entanto, também foram isoladas de amostras de linguiças toscana e suína dessas duas marcas. Uma amostra de linguiça calabresa da marca D estava contaminada com *Salmonella* spp. e com *E. coli*, que apresentava os genes *eae* e *hlyA*. Os resultados obtidos sugerem possível contaminação da planta de processamento e ou das matérias primas utilizadas na fabricação da linguiça. O isolamento de bactérias patogênicas nas amostras analisadas no presente trabalho indica que um mau processamento industrial, falhas de armazenamento, distribuição e/ou comercialização e a falta de devidas instruções de preparo nas embalagens podem resultar na comercialização e no consumo de embutidos cárneos contaminados.

Palavras-chave: Carne suína. Bactérias enteropatogênicas. Genes de virulência.

CAVALIN, Paola Bianca Barbosa. **Detection of *Salmonella* spp. and Diarrheagenic *Escherichia coli* in Sausages.** 2017. 60 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The prevention of pathogenic microorganisms contamination is one of the main challenges faced in the processed meat production. Brazil is the fourth biggest pork meat producer in the world. State of Paraná is the second biggest pork meat producer in the country and it was responsible for 21,0% of the slaughtered pork and 12,1% of the exportation in 2015. Small industries in the region of Londrina, Paraná, produce sausages that are comercialized in free fairs, small markets, bars and restaurants in the city. Although these industries are inspected by the Municipal Sanitary Surveillance, there are no data about the pathogenic microorganisms present in these products. The objective of this study was to investigate the presence of *Salmonella* spp. and diarrheagenic *E. coli* in sausages produced and comercialized in the region of Londrina, Paraná. Forty six samples of 3 types of sausage (pork, tuscan and calabresa) produced by 4 different producers (A, B, C and D) were analysed. *Salmonella* spp. and *E. coli* were analysed by conventional culture techniques. PCR assay were performed for the detection of diarrheagenic *E. coli* virulence genes (*eae*, *bfp*, *stx1*, *stx2*, *hlyA*, *ipaH*, *elt*, *aggR*, *aap* and *AA probe*). From 46 analysed samples, 12 (26,1%) were contaminated with *Salmonella* spp. and 33 (71,3%) with *E. coli*. Brand A presented the highest number of samples contaminated with *Salmonella* spp. (58,3%) as well as with *E. coli* (88,9%). High percentage of contamination by *E. coli* was also observed in pork and tuscan sausages from producer B (12 of 15 / 80,0%). Contamination by *Salmonella* spp. were higher in tuscan sausage (8 of 17 / 41,7%), compared to contamination found in pork sausage (4 of 22/ 18,2%), despite the brand analysed. The number of samples from producers C (n=5) and D (n=5) were much lower than those from producers A (n=18) and B (n=18). *E. coli* and *Salmonella* spp., however, were also isolated from tuscan and pork sausages of these two producers. One sample of calabresa sausage from producer D was contaminated with *Salmonella* spp. and with *E. coli* that carried *eae* and *hly* genes. The results suggest possible contamination from the processing plant and/or from the raw material used in the sausage manufacturing. The results indicate that a poor industrial processing or storage, distribution and/or comercialization failures, besides the lack of due preparation instructions in the packages may result in the comercialization and consumption of contaminated processed meats.

Keywords: Pork meat. Enteropathogenic bacteria. Virulence genes.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	OBJETIVOS	13
2.1.	Objetivo geral.....	13
2.2.	Objetivos específicos.....	13
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1.	Carne suína e derivados	14
3.2.	<i>Salmonella</i> spp. e salmonelose.....	16
3.3.	<i>Escherichia coli</i> diarreio gênicas	18
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1.	Amostragem.....	24
4.2.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	24
4.3.	Isolamento de <i>E. coli</i>	25
4.4.	Extração do DNA das colônias de <i>E. coli</i> para uso nos ensaios PCR	25
4.5.	Cepas de referência utilizadas nos ensaios PCR	25
4.6.	Condições utilizadas nos ensaios de PCR para pesquisa de genes de virulência de <i>E. coli</i> diarreio gênicas.....	26
4.7.	Análise dos produtos de amplificação	28
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
6.	RESULTADO.....	36

1. INTRODUÇÃO

A prevenção da contaminação por microrganismos patogênicos é um dos principais desafios enfrentados na produção de embutidos cárneos, uma vez que a presença de tais microrganismos nesse tipo de produto pode resultar tanto em doenças alimentares quanto em perdas econômicas aos seus produtores.

A atividade de água, o pH e os nutrientes disponíveis na carne crua favorecem o desenvolvimento de bactérias patogênicas. A manipulação da matéria prima e a higienização da planta de processamento inadequadas ou falhas no processamento, pós-processamento ou armazenamento de carnes e derivados podem levar à multiplicação de microrganismos causadores de doenças alimentares. A contaminação de ingredientes utilizados no preparo de embutidos, principalmente, dos tipos produzidos sem cozimento deve ser considerada. A contaminação presente nesses ingredientes pode persistir ou até mesmo aumentar durante o processamento e a comercialização do produto (CABRAL, 2014).

Diversos estudos relatam o isolamento de *E. coli* diarreiogênicas e *Salmonella* spp. em carne suína e seus derivados (MÜRMAN et al., 2009; LIMA et al., 2011; CHARIMBA, HUGO & HUGO, 2012; RANTSIOU, ALESSANDRIA & COCOLIN, 2012; CABRAL et al., 2014). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, 6.848 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) foram notificados entre 2007 e 2016 no país, que resultaram em 121.283 doentes, dos quais 17.517 foram hospitalizados (14,5%), e 111 (0,09%) foram a óbito. Os principais agentes etiológicos responsáveis pelos surtos foram *Salmonella* spp. (7,3%), *Escherichia coli* (7,3%) e *Staphylococcus aureus* (5,7%). Na maior parte dos surtos relatados (66,9%), não houve a identificação do alimento que veiculou o microrganismo. Dentre os surtos com alimentos identificados (2.266 / 33,1%), os alimentos mistos foram a principal via de transmissão desses patógenos. Carne suína in natura, processados e miúdos foram responsáveis por 103 (4,5%) dos surtos relatados com alimentos identificados (BRASIL, 2016).

Salmonella spp. está amplamente distribuída na natureza e a infecção dos rebanhos de suínos tende a ser um problema persistente nos sistemas de produção. Linfonodos submandibulares e tonsilas de suínos contaminados por *Salmonella* spp. podem permanecer na carcaça após o abate e, juntamente com músculos da região da cabeça serem empregados na fabricação de embutidos (CASTAGNA et al., 2004a). A carne suína in natura de boa qualidade microbiológica

é essencial para a inocuidade do produto acabado, assim como as condições higiênico-sanitárias utilizadas nas etapas de fabricação, transporte e armazenamento dos embutidos.

Sete grupos de *E. coli* diarreio gênicas são conhecidos: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), que inclui o subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* enteropatogênica típica e atípica (EPECt e EPECa), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* aderente invasora (AIEC). Os principais genes utilizados na caracterização genética destes grupos são *stx1* e *stx2* (STEC), *stx1*, *stx2*, *eae* e *hlyA* (EHEC), *eae* (EPECa), *eae* e *bfp* (EPECt), genes codificadores de enterotoxinas *LT* e *ST* e de fatores de colonização (ETEC), *ipaH* e *ial* (EIEC) e *aggR*, *aap* e *AA probe* (EAEC) (CROXEN et al., 2013). Os genes para a identificação genética de AIEC ainda não foram caracterizados e para DAEC não há consenso entre os autores (NATARO & KAPER, 1998; CROXEN et al., 2013).

A importância de isolados de EAEC e EPEC, principalmente a EPEC atípica como agentes de gastroenterite tem aumentado no Brasil (REGUA-MANGIA et al., 2004; FRANZOLIN et al., 2005; MORENO et al., 2010; LOZER et al., 2013; DIAS et al., 2016). Nos últimos anos, EPEC atípicas são mais frequentemente isoladas do que EPEC típicas, e da mesma forma que a *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC) são considerados patógenos emergentes (SCHMIDT, 2010).

O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína do mundo. Em 2015, foram produzidas aproximadamente 3,6 milhões de toneladas, das quais 15,2% foram exportadas. O consumo per capita anual foi de 15,1 kg. O Paraná é segundo maior estado produtor de carne suína no Brasil e foi responsável por 21% de total de suínos abatidos e por 12,1 % do total exportado no referido ano (ABPA, 2016).

Na região de Londrina, Paraná, há pequenas indústrias de embutidos que são comercializados em feiras livres, pequenos mercados, bares e restaurantes da cidade. A Vigilância Sanitária Municipal é o órgão responsável pela fiscalização dessas indústrias, porém não existem dados sobre microrganismos patogênicos presentes nesses produtos.

O objetivo deste estudo foi pesquisar a presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreio gênicas em amostras de linguiças produzidas e comercializadas na região de Londrina, Paraná.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a contaminação por *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreio gênicas em linguiças produzidas e comercializadas na região de Londrina, Paraná.

2.2. Objetivos específicos

- Pesquisar *Salmonella* spp. e *E. coli* diarreio gênicas em amostras de linguiças produzidas na região de Londrina, Paraná;
- Pesquisar os genes *eae*, *stx1*, *stx2*, *hlyA*, *ipaH*, *elt*, *bfp*, *aggR*, *aap* e *AA probe* em cepas de *E. coli* isoladas das amostras de linguiça analisadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Carne suína e derivados

Produtos cárneos processados ou preparados são aqueles cujas características originais da carne fresca foram alteradas intencionalmente por meio de tratamentos físicos, químicos e/ou biológicos. O processamento da carne fresca visa a elaboração de novos produtos e a redução de problemas de perecibilidade, transporte e armazenamento, prolongando sua vida de prateleira (BRESSAN & PERES, 2001). O processamento da carne não modifica de forma significativa as qualidades nutricionais originais, mas atribui características organolépticas como cor, sabor e aroma, próprias de cada processo (ARIMA & LEMOS, 2002). A utilização de cortes não aproveitados para o consumo in natura aumentam as alternativas para a comercialização.

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, “entende-se por linguiça o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado. Sua classificação varia conforme a tecnologia de fabricação empregada, podendo ser fresca, seca (curada e/ou maturada) ou cozida” (BRASIL, 2000). Por "carne de açougue" entende-se as massas musculares maturadas e demais tecidos que as acompanham, incluindo ou não a base óssea correspondente, procedentes de animais abatidos sob inspeção veterinária (BRASIL, 1952).

As linguiças suína, toscana e calabresa apresentam diferenças em suas formulações e procedimentos de preparo. A linguiça toscana tem como ingredientes retalho suíno (magro), retalho suíno (60% de gordura), água, gelo, sal, condimentos para linguiça toscana, agentes de cura, alho moído, pimenta branca moída, manjerona seca e glutamato. As carnes são moídas e recebem água e gelo em uma misturadeira, de modo que ocorra a extração de proteínas miofibrilares que têm a capacidade de reter água dentro da massa cárnea. A mistura é então inserida em tripas suínas e atadas com cordão em peças de aproximadamente 30 cm. A linguiça de carne suína tem como ingredientes retalho suíno (20% de gordura),

carne de cabeça suína, papada suína, emulsão de pele, retalho de barriga, emulsão de gordura, água, gelo, agente de cura rápida, fixador, tempero verde, glicose e condimentos para linguiça calabresa. A emulsão de pele é preparada em *cutter* (equipamento industrial utilizado tanto para corte como para mistura e preparo de alimentos) com uma parte de pele suína e uma parte de gelo. A emulsão de gordura também é preparada em *cutter*, com uma parte de isolado de soja, 5 partes de gordura e 5 partes de água. As carnes são moídas e misturadas com as emulsões, além de água, gelo e os demais ingredientes. Depois, são embutidas em tripa suína e atadas em gomos de tamanhos variados. A linguiça calabresa apresenta, além do retalho suíno (20% de gordura), toucinho, carne mecanicamente separada (CMS) de frango, água, gelo, proteína texturizada de soja, sal, condimento para linguiça calabresa, alho natural moído, cebola em pasta, vinho tinto seco e aditivos alimentares. As carnes e o toucinho são moídos e misturados aos demais ingredientes. A mistura é embutida em tripa suína, atada em gomos com tamanho característico e então pode opcionalmente ser submetida ao processo de defumação (TERRA, 1998).

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo devido à facilidade de seu processamento e produção de derivados, representando quase metade do consumo e da produção total de carnes (MIELE, 2006). O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína do mundo. Em 2015, foram produzidas 3,6 milhões de toneladas de carne suína no Brasil, das quais 15,2% foram exportadas, com uma receita de US\$1.279.000,00. O Paraná é o segundo maior estado produtor de carne suína no país e foi responsável por 21,5% do total de suínos abatidos em 2015. O consumo per capita aumentou de 14,7 kg por habitante em 2014 para 15,1 kg por habitante em 2015. A maior parte dos produtos exportados corresponde a cortes (83%), seguido de miúdos (9,3%), carcaça (2,2%), preparações (1,7%) e embutidos (1,6%). O porto de Itajaí, Santa Catarina, exportou 52,7% e o porto de Paranaguá, no Paraná, 8% da produção de carne suína produzida no país em 2015 (ABPA, 2016).

A legislação brasileira estabelece, segundo a Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os seguintes padrões microbiológicos para linguiças: 10^3 de coliformes a 45°C/g, 5×10^3 de estafilococos coagulase positiva/g e ausência de *Salmonella* spp./25g.

3.2. *Salmonella* spp. e salmonelose

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e apresenta duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. A espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (GUILBOURDENCHE et al., 2007). As propriedades de aglutinação dos antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) são utilizadas para diferenciar os mais de 2600 sorovares de *Salmonella*. A tipagem do antígeno somático (O) determina o sorogrupo e a combinação do antígeno somático com o antígeno flagelar determina o sorovar. Antígenos capsulares (Vi) estão presentes em *S. enterica* subsp. *enterica* nos sorovares Typhi, Paratyphi C e Dublin. A sorotipagem inclui mais de 150 antígenos O e H para a caracterização dos sorovares de *Salmonella*, dos quais 1.478 são *S. enterica* subsp. *enterica* (LEVIN, 2009).

Isolados de *S. enterica* subsp. *enterica* causam aproximadamente 99% das infecções por *Salmonella* em humanos e animais de sangue quente (McCLELLAND et al., 2001). Os sorovares de outras subespécies são mais comumente encontrados livres no ambiente e em animais pecilotérmicos, mas raramente em humanos (UZZAU et al., 2000).

Do ponto de vista clínico, os sorovares de *Salmonella* podem ser agrupados com base em seus hospedeiros e na manifestação da doença. *Salmonella* Typhi é um patógeno específico de humanos e causa a febre tifóide. *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* restringem-se à infecção de aves e causam uma síndrome severa nesses animais. Esses sorovares causam infecção intestinal subclínica em frangos após uma pequena infecção sistêmica e as aves infectadas podem se tornar portadores crônicos, levando à postura de ovos infectados (SHIVAPRASAD, 2000). A infecção em humanos por sorovares capazes de infectar diversas espécies de hospedeiros, tais como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, leva à enterocolite geralmente limitada ao trato gastrointestinal e que raramente se dissemina para órgãos sistêmicos (STEVENS, HUMPHREY & MASKELL, 2009). Os sorovares capazes de causar doença em vários tipos de hospedeiros são os responsáveis pela maioria das salmoneloses gastrointestinais humanas (VELGE, WIEDEMANN & ROSSELIN, 2005).

Diferentes sorovares de *Salmonella* podem induzir a diferentes

patologias em um mesmo hospedeiro. Em bezerros, a inoculação oral de *S. Dublin* produz infecção sistêmica grave, enquanto que *S. Gallinarum* é avirulenta e *S. Typhimurium* leva a uma enterite aguda (PAULIN et al., 2002). A patogênese não depende somente da dose e da via de inoculação, mas também de fatores genéticos e do estado imunológico do hospedeiro (CALENGE, KAISER & BEAUMONT, 2010).

A infecção por *Salmonella* spp. em humanos tem início pela ingestão de água ou alimentos contaminados, seguida pela passagem da bactéria pelo estômago até alcançar o intestino, onde se adere e penetra nas células epiteliais. Acredita-se que a passagem das bactérias através da parede intestinal inicia-se por transcitose, que consiste na invasão de enterócitos ou células M pelo lado apical, migração para o lado basolateral e exocitose dentro do espaço intersticial da lâmina própria (MULLER et al., 2012).

A invasão celular é um importante mecanismo de patogenicidade que influencia na virulência de *Salmonella*. O fenótipo invasivo é determinado pelo sistema de secreção do tipo III, responsável pela translocação de proteínas para o interior da célula do hospedeiro e pelo rearranjo de seu citoesqueleto, formando ondulações da superfície da membrana celular denominadas *ruffles*, que resultam no engolfamento da bactéria para o interior da célula. Mais de 30 genes específicos têm sido utilizados na detecção e caracterização de *Salmonella* por reação em cadeia da polimerase (PCR), dentre os quais estão genes invasivos (*inv*), genes envolvidos na regulação dos genes *inv*, genes codificadores de fímbrias e genes de resistência a antibióticos (LEVIN, 2009).

As razões pelas quais alguns sorovares de *Salmonella* ficam restritos ao intestino enquanto outros se deslocam a órgãos distais permanecem incertas. Uma característica essencial de patogenicidade de *Salmonella* é a sua interação com células fagocíticas e não fagocíticas. A sua entrada na célula hospedeira é crítica para a sobrevivência e o estabelecimento da doença no hospedeiro. Em geral, patógenos bacterianos intracelulares entram em células eucarióticas não fagocíticas por dois mecanismos, que são diferenciados inicialmente pelo remodelamento da membrana celular. O mecanismo *Trigger* consiste em um rearranjo crítico do citoesqueleto conhecido como *membrane ruffles*. Em contrapartida, no mecanismo *Zipper* ou “entrada mediada por receptor”, a bactéria invasora é fortemente ligada à membrana celular do hospedeiro e pequenos rearranjos da proteína citoesquelética ocorrem pelo contato específico entre os

ligantes da bactéria (invasinas) e os receptores da superfície celular (VELGE, 2012). Uma diferença importante entre os mecanismos de entrada *Trigger* e *Zipper* é que o primeiro é desencadeado de dentro pela ação de efetores bacterianos liberados pelos sistemas de secreção, enquanto que o outro é promovido por fora pela ativação dos receptores da célula hospedeira. No entanto, em ambos os casos, a bactéria sequestra os processos fisiológicos da célula através da modulação de cascatas de sinalização celular. Um estudo relatou que *Salmonella* é a primeira bactéria capaz de entrar nas células utilizando ambos os mecanismos (ROSSELIN et al., 2010). Uma ideia emergente é que linhagens de *Salmonella* podem entrar em células não fagocíticas por várias vias envolvendo o mecanismo *Trigger* ou *Zipper*, uma teoria que vai de encontro ao paradigma prevalente da patogênese da *Salmonella* que afirma que o sistema de secreção da ilha de patogenicidade tipo III é essencial para a invasão da célula hospedeira (VELGE, 2012).

Uma ampla variedade de alimentos já foi associada à salmonelose, porém a prevalência de *Salmonella* spp. em alimentos é muito variável. A maioria das infecções ocorre através da ingestão de alimentos de origem animal. Além dos ovos e da carne de aves e derivados, a carne suína e seus derivados podem ser fonte de transmissão de *Salmonella* spp. para o ser humano. O desafio no controle de *Salmonella* spp. nos sistemas intensivos de criação está relacionada com a complexidade de sua epidemiologia. Algumas fontes de introdução de *Salmonella* spp. em granjas são bem conhecidas e envolvem, principalmente, aquisição de animais infectados, água, ração e ingredientes contaminados, vetores, como roedores e pássaros, e funcionários ou visitantes (DAVIES & FUNW, 1999).

Estudos indicaram a alta prevalência de suínos portadores assintomáticos de *Salmonella* spp. tanto no trato intestinal, como em linfonodos submandibulares e tonsilas (CASTAGNA et al., 2004). A entrada de animais portadores de *Salmonella* spp. no frigorífico aumenta o risco da contaminação da matéria prima a ser utilizada na fabricação de embutidos devido à contaminação cruzada das carcaças empregadas na fabricação desses alimentos. Assim, boas práticas de fabricação podem ser insuficientes para garantir a inocuidade do produto final.

3.3 *Escherichia coli* diarreiogênicas

Escherichia coli tem como habitat primário o intestino de humanos e animais. Alguns isolados tem a capacidade de causar doenças intestinais e são chamados de *E. coli* diarreio gênicas. Os genes responsáveis por essas doenças são adquiridos por meio de fagos, plasmídios ou por transferência de genes, ou gerados por mutações (CROXEN & FINLAY, 2010).

A diarreia é uma doença responsável por altos índices de mortalidade em todo o mundo, principalmente em crianças com menos de 5 anos de idade. Apesar de ser causada por diversos agentes etiológicos, a *E. coli* é considerada o principal deles. As baixas doses de infecção e a diversidade de meios de transmissão possíveis facilitam a propagação das doenças, que podem atingir o trato gastrointestinal, a corrente sanguínea, o sistema urinário e o sistema nervoso central (NATARO & KAPER, 1998).

Sete grupos de *E. coli* diarreio gênicas são conhecidos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Essas variantes patogênicas apresentam diversos mecanismos de patogenicidade em comum, no entanto a instalação da doença e suas complicações variam significativamente (CROXEN & FINLAY, 2010). Os fatores de virulência ou marcadores patogênicos expressos pelos vários isolados de *E. coli* diarreio gênicas incluem a habilidade de produzir toxinas no hospedeiro, tais como toxinas shiga (Stx1 e/ou Stx2), enterotoxinas termolábeis (LTa/b), enterotoxinas termoestáveis (STa/b), toxinas de distenção citoletais (CDTs) e enterotoxinas *Shigella* (ShET1/2). Além disso, plasmídios específicos de invasão, fatores de colonização, fímbrias e adesinas também afetam a virulência de isolados de *E. coli* (CROXEN & FINLAY, 2010).

EPEC e EAEC são os grupos de *E. coli* diarreio gênicas mais prevalentes em crianças no Brasil (DIAS et al., 2016). EPEC, diferente das STEC LEE-positivas, não produzem toxina Shiga e diferem de outras *E. coli* diarreio gênicas por apresentarem uma ilha de patogenicidade denominada de *locus of enterocyte effacement* (LEE), que codifica os genes responsáveis pelo fenótipo *attaching and effacing* (A/E), caracterizado pela formação de lesões distintas na superfície das células epiteliais do intestino delgado (CROXEN et al., 2013).

Isolados de EPEC que apresentam o plasmídio com fator de

aderência EAF são classificados como EPEC típicas e os isolados que não apresentam esse plasmídio são classificados como EPEC atípicas. O gene *bfp*, localizado no plasmídio EAF, codifica uma fímbria chamada *bundle forming pilus*, que tem papel na adesão inicial da bactéria ao epitélio intestinal do hospedeiro e na aderência interbacteriana (GIRON, HO & SCHOOLNIK, 1991). Após a adesão inicial da bactéria, o sistema de secreção do tipo III, localizado na ilha de patogenicidade LEE, injeta no interior das células hospedeiras diversas proteínas tais como a Tir, que forma um dímero na membrana da célula do enterócito, atuando como receptor para a intimina, uma proteína da membrana externa bacteriana codificada pelo gene *eae* (JERSE et al., 1990). A ligação da intimina ao receptor leva à polimerização da actina, com a formação dos pedestais aos quais a bactéria se adere intimamente e o desaparecimento das microvilosidades, o que caracteriza a lesão *attaching and effacing* (A/E). A aderência íntima da bactéria às células intestinais induz diversas vias de transdução de sinais no hospedeiro, levando à alteração dos processos celulares de modo a favorecer o patógeno.

E. coli enteroagregativa (EAEC) é causa persistente de diarreia em paciente portadores do vírus HIV e em crianças de áreas endêmicas, além de ser o agente causador da diarreia do viajante. É caracterizada por um padrão de aderência agregativa observado em cultura de células epiteliais, devido aos fatores de colonização chamados de fatores de aderência agregativa. Muitos de seus fatores de virulência estão localizados no plasmídio AA de 60 a 65-MDa, incluindo a adesina fimbrial de aderência agregativa, o ativador transcricional dos fatores de aderência agregativa *aggR* e uma proteína antiagregativa (dispersina) codificada pelo gene *aap*. A dispersina modula a adesão das fímbrias e facilita a penetração do microrganismo através do muco intestinal (OKHUYSEN & DUPONT, 2010). A bactéria se adere à mucosa intestinal através de fímbrias de aderência agregativa e provoca danos nesse epitélio, levando à esfoliação das células epiteliais. Citocinas e diversas enterotoxinas podem contribuir para uma diarreia severa, que exhibe características semelhantes à enterite inflamatória (CERNA, NATARO & ESTRADA-GARCIA, 2003).

E. coli produtora de toxina shiga (STEC) é caracterizada pela produção de toxinas shiga 1 e 2, que são expressas pelos genes *stx1* ou *stx2* (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). As toxinas shiga atravessam a monocamada epitelial do intestino, induzindo a inibição proteica e a apoptose das células. Essa

toxina é responsável por causar uma lesão vascular renal, através da ligação à globotriaosilceramida (Gb3), um glicopeptídeo que se encontra na superfície das células endoteliais renais. Isso faz com que as células endoteliais dos capilares glomerulares liberem substâncias vasoativas e agregantes plaquetários, levando à formação de edema e microtrombos. Dessa maneira, os eritrócitos não conseguem passar pelos glomérulos e são destruídos, resultando assim na anemia microangiopática (SCHEIRING, ANDREOLI & ZIMMERHACKL, 2008). A consequência da ação da toxina shiga é a possibilidade de ocorrer insuficiência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia, que caracterizam a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) é um subtipo de STEC, que possui a ilha de patogenicidade LEE. Como ocorre com EPEC, EHEC se adere à mucosa intestinal pela expressão das proteínas intimina e Tir, cujos genes estão localizados na ilha de patogenicidade LEE, resultando na lesão A/E (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

E. coli enterotoxigênica (ETEC) causa diarreia sem febre e distingue-se dos demais grupos de *E. coli* pela produção de enterotoxinas. ETEC produz enterotoxinas termolábeis (LT) e/ou termoestáveis (ST). Isolados de ETEC podem expressar somente LT ou ST, ou ambas, e pode apresentar um ou mais fatores de colonização. Toxinas LT são estruturalmente e funcionalmente similares à enterotoxina produzida pelo *Vibrio cholerae* e classificadas em LTI (associada a humanos e animais) e LTII (associada primariamente a animais). Há diversas variantes de ST, incluindo ST1 e ST2 (NATARO & KAPER, 1998).

E. coli enteroinvasiva (EIEC) é bioquimicamente, geneticamente e patogenicamente similar à *Shigella* spp. Ela é capaz de invadir as células epiteliais do cólon, determinado pela presença do gene *ipaH* (*invasion plasmid antigen H*), provoca a lise do fagossomo e se move através da célula por meio dos microfilamentos de actina. A bactéria pode se mover lateralmente pelo epitélio, célula a célula, ou pode sair da célula e entrar novamente pela membrana plasmática baso lateral (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

E. coli de adesão difusa (DAEC) são identificadas pelo padrão de adesão em cultura de células. A maioria das cepas DAEC possui adesinas da família Afa/Dr.

A sorotipagem é a técnica mais empregada para a diferenciação dos

isolados de *E. coli* diarreio gênica, mas a sorologia nem sempre é suficiente para identificar um grupo diarreio gênico, pois não necessariamente existe correlação entre o sorotipo e a presença dos fatores de virulência. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta que pode ser usada na detecção dos genes específicos de virulência presentes em cada grupo de *E. coli* diarreio gênica (MULLIS, 1990).

Paton & Paton (1998) padronizaram um ensaio de PCR multiplex para detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* e *hlyA* e testaram diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores. Aranda et al. (2007) desenvolveram uma PCR multiplex para diferenciar EPEC típica e atípica, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Esses autores utilizaram os genes *eae* e *bfpA* para EPEC, o gene *aggR* para EAEC, os genes *elt* e *est* para ETEC, o gene *ipaH* para EIEC e o gene *stx* para STEC. Cerna, Nataro & Estrada-Garcia (2003) desenvolveram uma PCR multiplex para a detecção de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) com o uso de três genes plasmidiais (*AA probe*, *aap* e *aggR*). Os mesmos pares de iniciadores foram utilizados por outros autores (Elder et al., 2000; Bosilevac & Koohmaraie, 2011; Kagambega et al., 2012; Canizalez-Roman et al., 2013; Puño-Sarmiento et al., 2014) que comprovaram a possibilidade de utilização desses iniciadores para a detecção dos referidos genes e, conseqüentemente, para a identificação dos grupos diarreio gênicos de *E. coli*.

A epidemiologia de doenças de origem alimentar é muito complexa, uma vez que a origem da contaminação pode ocorrer de diversas maneiras. Diversos fatores podem influenciar na contaminação de produtos cárneos por *E. coli*: carcaças contaminadas pelas fezes dos animais durante procedimentos de abate e limpeza, equipamentos e utensílios contaminados nas indústrias, práticas de higiene inadequadas ou ausentes por parte dos funcionários, contaminação veiculada pelo ar e presença de vetores como roedores, insetos e outros animais no ambiente industrial. A matéria prima de alimentos de origem animal pode estar contaminada com microrganismos patogênicos provenientes de animais subclínicamente infectados ou portadores assintomáticos (SILVA et al., 2010).

A linguiça suína é um dos produtos cárneos que frequentemente apresentam-se contaminados com *E. coli* (SMITH et al., 1991; NORMANNOA et al., 2004). A qualidade da carne crua e dos demais ingredientes, a atividade de água, o pH e a ausência ou o processamento térmico inadequado contribuem diretamente

para a contaminação e a multiplicação de microrganismos durante o preparo da linguiça (SARTZ et al., 2008).

Estudos conduzidos no Rio Grande do Sul e em Goiás que realizaram análise de *Escherichia coli* não diarreiogênica por método tradicional em linguiça suína fresca mostraram percentagens de contaminação por *E. coli* em 88,9% e 75,0% das amostras, respectivamente (GIEHL et al., 2010; GEORGES, 2015). A legislação brasileira não estabelece padrões microbiológicos para *E. coli* nesse tipo de alimento. Um estudo realizado em Marrocos encontrou *E. coli* em 35,5% das amostras de linguiça analisadas, das quais 17,5% apresentaram os genes de virulência *eae* e *stx1*, o que caracteriza uma EHEC (BADRI, 2009). Na África do Sul, estudo semelhante analisou amostras de linguiça do tipo *boerewor* (linguiça fresca tradicional da região) das quais 28,6% estavam contaminadas com EPEC e STEC (CHARIMBA, HUGO & HUGO, 2012).

Um surto de *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC) associada à linguiça seca fermentada foi documentado em 1996, na Austrália. Vinte crianças foram hospitalizadas com Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) e uma foi a óbito. *E. coli* produtora de toxina shiga foi isolada de todos os pacientes. *E. coli* com genes *stx1* ou *stx2* também foram isoladas das amostras de linguiça coletadas nas casas desses pacientes (JUREIDINI, 1997). Esses trabalhos mostram a importância de não apenas avaliar nestes produtos a contagem de coliformes termotolerantes como analisar também a presença de genes de virulência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Foram analisados três tipos de linguiças de carne suína, vendidas comercialmente como linguiça toscana, linguiça suína e linguiça calabresa, produzidas por quatro diferentes produtores da região de Londrina, identificados neste trabalho como A, B, C e D. Um total de 46 amostras de linguiça (22 suínas, 17 toscanas e 7 calabresas) foram adquiridas semanalmente em quatro diferentes estabelecimentos comerciais da região, entre os meses de março e julho de 2015. Houve diferença no número de amostras adquiridas de cada produtor em razão da disponibilidade de cada uma delas: 18 da marca A, 18 da marca B, 5 da marca C e 5 da marca D. As amostras foram transportadas ao laboratório sob refrigeração em caixas de isopor com gelo, mantendo-se temperatura não superior a 8°C durante o transporte. As análises foram realizadas em até 24 horas após a coleta.

4.2. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Vinte e cinco gramas (25 g) de amostras foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada em homogeneizador de amostras (Stomacher 400, Seward, Worthing, Inglaterra). Após a incubação a 35°C por 24 horas, alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL do enriquecimento não seletivo foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo Selenito Cistina (SC) e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia). O caldo SC foi incubado a 35°C e o caldo RV a 42°C por 24 horas. O ágar Hektoen e o ágar Xilose Lisina Desoxicolato de Sódio (XLD) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia) foram utilizados como meios seletivo-diferenciais, incubados a 35°C por 24 horas. Colônias características de *Salmonella* spp. foram submetidas à triagem bioquímica com utilização das provas de motilidade, produção de indol, descarboxilação de lisina e hidrólise de ureia. A confirmação do gênero foi realizada por meio da técnica de aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella*

(Probac do Brasil, São Paulo, Brasil).

4.3. Isolamento de *E. coli*

Vinte e cinco gramas (25 g) de amostra foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada. Alíquotas de 1 mL do pré-enriquecimento foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de caldo lauril sulfato de sódio (CLS) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) e incubados a 35°C por 24 horas. Após a incubação, uma alíquota dos tubos de CLS foi inoculada em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) e incubados a 35°C por 24 horas. Colônias características lactose positiva e não produtoras de H₂S foram submetidas à triagem bioquímica, por meio das provas de indol, fermentação da glicose com produção de gás e utilização de citrato de sódio como única fonte de carbono. As colônias identificadas como *E. coli* foram armazenadas em ágar nutriente em temperatura ambiente.

4.4. Extração do DNA das colônias de *E. coli* para uso nos ensaios PCR

Os isolados armazenados em ágar nutriente foram ressuspensos em solução salina estéril e cultivados em ágar MacConkey (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India). Após incubação a 35°C por 24 horas, uma alçada das colônias de cada placa de MacConkey foi ressuspensa em 200 µL de água estéril, fervida em banho-maria por 10 minutos e centrifugada a 10000 g por 5 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas como DNA alvo para as reações de amplificação.

4.5. Cepas de referência utilizadas nos ensaios PCR

As cepas de *E. coli* diarreiogênicas utilizadas como controles positivos nos ensaios de PCR foram EHEC ATCC® 43889™ (*stx2+* e *ea+*), EHEC H30 (*stx1+*), EIEC O152 (*ipaH+*), STLT (*elt+*), EAEC O42 (*aggR+*) e EPEC 2348 (*bfp+*). Como controle negativo foram utilizadas *E. coli* K12, Hb101 e DH5α.

4.6. Condições utilizadas nos ensaios de PCR para pesquisa de genes de virulência de *E. coli* diarreio gênicas

Para a detecção das *E. coli* diarreio gênicas foram utilizados os seguintes marcadores de virulência: *eae* (gene estrutural para intimina presente em EPEC e EHEC), *bfp* (gene estrutural para *bfp* presente em EPEC típica), *aggR* (ativador transcricional para AAFs de EAEC), *elt* e *est* (enterotoxinas de ETEC), *ipaH* (antígeno H do plasmídio de invasão encontrado em EIEC), *stx1* e *stx2* (toxinas Shiga de EHEC) e *hlyA* (enterohemolisina encontrada em EHEC). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados bem como o tamanho das sequências de DNA amplificadas estão descritos na tabela 1. Todas as reações de amplificação foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA).

A detecção dos genes de virulência *eae*, *stx1*, *stx2* e *hlyA* foi realizada por PCR Multiplex empregando os pares de iniciadores testados previamente por Paton & Paton (1998), com algumas modificações. A amplificação foi realizada utilizando 3 µL de DNA da amostra em 25 µL de mistura de reação contendo 1,5 U de Taq polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA), 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen®), 20 pmol/L de cada iniciador e água. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 15 ciclos a 95°C por 1 minuto, hibridação a 65°C por 2 minutos e polimerização da sequência alvo a 72°C por 1,5 minutos; 20 ciclos a 94°C por 1 minuto, hibridação a 60°C por 2 minutos e polimerização da sequência alvo a 72°C por 2,5 minutos e um ciclo final de polimerização a 72°C por 7 minutos.

A detecção dos genes de virulência *ipaH* e *elt* foi realizada por PCR Multiplex empregando os pares de iniciadores testados previamente por Aranda (2004), com algumas modificações. A amplificação foi realizada utilizando-se 2,5 µL de DNA da amostra em 25 µL de mistura de reação contendo 1 U de Taq polimerase (Invitrogen®), 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen®) e 20 pmol/L de cada iniciador. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; seguida de 40 ciclos a 95°C por 1 minuto, hibridação a 54°C por 2 minutos e polimerização da sequência alvo a 72°C por 1 minuto e polimerização da sequência alvo final por 7

minutos a 72°C.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes de virulência de *E. coli* diarreio gênicas.

Genes	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Produto da PCR (pb)
<i>hlyA</i> ¹	(F) GCATCATCAAGCGTACGTTCC (R) AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534
<i>eae</i> ¹	(F) GACCCGGCACAAGCATAAGC (R) CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384
<i>stx1</i> ¹	(F) ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC (R) AGAACGCCCACTGAGATCATC	180
<i>stx2</i> ¹	(F) GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC (R) TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255
<i>bfp</i> ²	(F) AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC (R) GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326
<i>elt</i> ²	(F) GGCGACAGATTATACCGTGC (R) CGGTCTCTATATCCCTGTT	450
<i>ipaH</i> ²	(F) TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC (R) GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	600
<i>aap</i> ³	(F) CTTGGGTATCAGCCTGAATG (R) AACCCATTCGGTTAGAGCAC	310
<i>aggR</i> ³	(F) CTAATTGTACAATCGATGTA (R) AGAGTCCATCTCTTTGATAAG	457
<i>AA probe</i> ³	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCAT (R) CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	629

¹ Paton & Paton, 1998; ² Aranda et al., 2004; ³ Cerna, Nataro & Estrada-Garcia, 2003.

A detecção do gene de virulência *bfp* foi realizada empregando os pares de iniciadores testados previamente por Aranda (2004), com algumas modificações. A amplificação do DNA da bactéria foi realizada com 2,5 µL de DNA da amostra em 25 µL de mistura de reação contendo 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen) e 20 pmol/L do primer *bpf*. As condições de

amplificação foram: um ciclo inicial a 50°C por 2 minutos; desnaturação a 95°C por 3 minutos; 40 ciclos a 95°C por 40 segundos, a 59°C por 40 segundos e a 72°C por 40 segundos; polimerização da sequência alvo final a 72°C por 7 minutos.

A detecção dos genes de virulência *aap*, *aggR* e *AA probe* foi realizada por PCR Multiplex empregando os pares de iniciadores testados previamente por Cerna, Nataro & Estrada-Garcia (2003), com algumas modificações. A amplificação foi realizada utilizando-se 2,5 µL de DNA da amostra em 20 µL de mistura de reação contendo 1 U de Taq polimerase (Invitrogen®), 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen®), 10 pmol/L do primer *aap*, 15 pmol/L do primer *aggR* e 20 pmol/L do primer *AA probe*. As condições de amplificação foram: um ciclo inicial a 50°C por 2 minutos; desnaturação a 95°C por 3 minutos; 40 ciclos a 95°C por 40 segundos, a 59°C por 40 segundos e a 72°C por 40 segundos; polimerização da sequência alvo final a 72°C por 7 minutos.

4.7. Análise dos produtos de amplificação

Alíquotas de 10 µL de cada mistura de reação foram homogeneizadas com 1 µL de Gel Red 20 x (Biotium®, Hayward, CA, USA). A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 2% diluído em tampão Tris-Borato-EDTA 1x [Tris (Invitrogen®) 90 mM; ácido bórico (Nuclear) 90 mM, EDTA (Nuclear) 2 mM], em cuba horizontal com o mesmo tampão a 70 V durante 1 hora e 40 minutos. Um marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen®) foi utilizado em cada corrida. O gel foi visualizado em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia Molecular, Cotia, São Paulo, Brasil) e fotografado em sistema de fotodocumentação L.Pix Image Versão 1.21 (Loccus Biotecnologia Molecular).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual ABPA 2016**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-aneais>. Acesso em: 12 de janeiro de 2017.

Aranda, K. R. S.; Araujo, J. M.; Tabarelli, G. F.; Fabbricotti, S. H.; Fagundes-Neto, U.; Mendes, C. M. F., Scaletsky, I.C.A. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**. 45: 3396-3399. 2007.

Arima, H. K.; Lemos, A. L. S. C. **Importância da qualidade das matérias-primas cárneas no processamento de embutidos. Princípios do processamento de embutidos cárneos**. 1 ed. Campinas - SP: CTC/ITAL. 1:137-150. 2002.

Badri, S. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from food in Casablanca (Morocco). **Food Control**. 20(6):560-564. 2009.

Bosilevac, J. M., & Koohmaraie, M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. **Applied and environmental microbiology**. 77(6). 2103-2112. 2011.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA**. Rio de Janeiro, 29 de março de 1952.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº4. Anexo III - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça**. Brasília, 05 de abril de 2000.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Dezembro de 2016. Disponível em:

<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/09/Apresentacao-Surtos -DTA-2016.pdf>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

Bressan, M.C.; Perez, J. R. O. **Tecnologia de Carnes e Pescado**. Lavras: UFLA/FAEPE. Textos Acadêmicos, 2001.

Cabral, C.C.; Conte-Junior, C.A.; Silva, J. T.; Paschoalin, V. M. F. *Salmonella* spp. contamination in fresh pork and chicken sausages marketed in Niterói and Rio de Janeiro, Brazil. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**. 9:243-249. 2014.

Calenge, F.; Kaiser, A.; Beaumont, C. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. **Genetic Selection Evolution**. 42(1):11. 2010.

Canizalez-Roman, A., Gonzalez-Nuñez, E., Vidal, J. E., Flores-Villaseñor, H., & León-Sicairos, N. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. **International Journal of Food Microbiology**. 164(1):36-45. 2013.

Castagna, S. M. F.; Schwarz, P.; Canal, C. W.; Cardoso, M. R. I. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* spp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**. 32(2):141-147. 2004a.

Castagna, S. M. F.; Schwarz, P.; Canal, C. W.; Cardoso, M. Presença de *Salmonella* spp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 56(3):300-306. 2004b.

Cerna, J.F.; Nataro, J.P.; Estrada-Garcia, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. 41(5): 2138-2140. 2003.

Charimba, G.; Hugo, C.; Hugo, A. The incidence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in minced beef and boerewors. **Food Research International**. 47: 353-358. 2012.

Croxen, M.; Finlay, B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**. 8(1):26-38. 2010.

Croxen, M.A.; Law, R.J.; Scholz, R.; Keeney, K.M.; Wlodarska, M.; Finlay, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**. 26(4):822-880. 2013.

Davies, P.R.; Funk, J. **Epidemiology and control of *Salmonella* in pork-some of the questions**. In: International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. Washington DC. Proceedings. Washington: Biomedical Communications Center, p. 1-11, 1999.

Dias, R.C.; dos Santos, B.C.; dos Santos, L.F.; Vieira, M.A.; Yamatogi, R.S.; Mondelli, A.L.; Sadatsune, T.; Sforcin, J.M.; Gomes, T.A.; Hernandez, R.T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E.coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. 124(4):299-308. 2016.

Elder, R. O.; Keen, J. E.; Siragusa, G. R.; Barkocy-Gallagher, G. A.; Koohmaraie, M.; Laegreid, W. W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 97(7): 2999-3003. 2000.

Franzolin, M.R.; Alves, R.C.; Keller, R.; Gomes, T.A.; Beutin, L.; Barreto, M.L.; Milroy, C.; Strina, A.; Ribeiro, H.; Trabulsi, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 100(4):359-63. 2005.

Giron, J.; Ho, A.; Schoolnik, G. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**. 254(5032):710-713. 1991

Guibourdenche, M.; Roggentin, M.; Mikoleit, P. I.; Fields, J.; Bockemuhl, P. A.

Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research Microbiology**. 161:26-29. 2010.

Jerse, A.; Yu, J.; Tall, B.; Kaper, J. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 87(20):7839-7843. 1990.

Jureidini, K. Outbreak of HUS associated with verotoxigenic *E. coli* and dry fermented sausage. **Kidney International**. 51(4):1305. 1997.

Kagambega, A.; Martikainen, O.; Siitonen, A.; Traore, A. S.; Barro, N.; Haukka, K. (2012). Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso. **MicrobiologyOpen**. 1(3):276-284. 2012.

Kaper, J.; Nataro, J.; Mobley, H. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. 2(2):123. 2004.

Levin, R. The use of molecular methods for detecting and discriminating *Salmonella* associated with foods - A review. **Food Biotechnology**. 23(4):313-367. 2009.

Lima, B. R. C. C.; Canto, A. C. V. C. S.; Nascimento, R. S.; Franco, R. M.; Nascimento, E. R. Prevalência de *Salmonella* spp. na superfície e no interior de linguiça frescal suína comercializada no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 33(3):133-136. 2011.

Lozer, D.; Souza, T. B.; Monfardini, M. V.; Vicentini, F.; Kitagawa, S. S.; Scaletsky, I. C.; Spano, L. C. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infectious Diseases**. 13(1):1471-2334. 2013.

McClelland, M.; Sanderson, K. E; Spieth, J.; Clifton, S. W.; Latreille, P.; Courtney, L. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2.

Nature. 413:852-856. 2001.

Moreno, A. C. R.; Fernandes Filho, A.; Gomes, T. do A. T.; Ramos, S. T. S.; Montemor, L. P. G.; Tavares, V. C.; Santos Filho, L. dos; Irino, K.; Maartinez, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** 66(1):50-57. 2010.

Muller, A. J.; Kaiser, P.; Dittmar, K. E.; Weber, T. C.; Haueter, S.; Endt, K. *Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. **Cell Host Microbe.** 11:19-32. 2012.

Mullis, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique (Paris).** 48(8):579-582. 1990.

Mürmann, M.C.S. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control.** 20(3):191-195. 2009.

Nataro, J.; Kaper, J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews.** 11(1):142-201. 1998.

Normannoa, G.; Parisib, A.; Dambrosioa, A.; Quagliaa, N.C.; Montagnab, D.; Chioccoc, D.; Celanoa, G.V. Typing of *Escherichia coli* O157 strains isolated from fresh sausage. **Food Microbiology.** 21:79-82. 2004.

Okhuysen, P.C.; Dupont, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. **Journal Infectious Disease.** 202(4):503-505. 2010.

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. 36(2):598-602. 1998.

Paulin, S. M.; Watson, P. R.; Benmore, A. R.; Stevens, M. P.; Jones, P. W.; Villarreal-Ramos, B. Analysis of *Salmonella enterica* serotype-host specificity in calves: avirulence of *S. enterica* serotype Gallinarum correlates with bacterial dissemination from mesenteric lymph nodes and persistence in vivo. **Infection Immunology.** 70:6788-6797. 2002.

Puño-Sarmiento, Juan; Gazal, Luis; Medeiros, Leonardo; Nishio, Erick; Kobayashi, Renata; Nakazato, Gerson. Identification of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains from Avian Organic Fertilizers. **International Journal of Environmental Research and Public Health.** 11:8924-8939. 2014.

Rantsiou, K.; Alessandria, V.; Cocolin, L. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food products of animal origin as determined by molecular methods. **International Journal of Food Microbiology.** 154:37-43. 2012.

Regua-Mangia, A.H.; Gomes, T.A.; Vieira, M.A.; Andrade, J.R.; Irino, K.; Teixeira, L.M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhea in Rio de Janeiro. **The Journal of Infection.** 48(2):161-167. 2004.

Rosselin, M.; Virlogeux-Payant, I.; Roy, C.; Bottreau, E.; Sizaret, P. Y.; Mijouin, L. Rck of *Salmonella enterica*, subspecies enterica serovar Enteritidis, mediates Zipper-like internalization. **Cell Research.** 20:647-664. 2010.

Sartz, L.; De Jong, B.; Hjertqvist, M.; Plym-Forsell, L.; Alsterlund, R.; Löfdahl, S.; Osterman, B.; Ståhl, A.; Eriksson, E.; Hansson, H.B.; Karpman, D. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. **Epidemiology Infection.** 136:370-380. 2008.

Scheiring, J.; Andreoli, S.; Zimmerhackl, L. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). **Pediatric Nephrology.** 23(10):1749-

1760. 2008.

Schmidt, M. A. LEEdways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. **Cellular Microbiology**. 12:1544-1552. 2010.

Shivaprasad, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue Scientifique et Technique**. 9:405-424. 2000.

Silva, M.; Marvulo, M.; Mota, R.; Silva, J. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 30(7):573-580. 2010.

Smith, H. R.; Cheasty, T.; Roberts, D.; Thomas, A.; Rowe, B. Examination of retail chickens and sausages in Britain for vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**. 57:2091-2093. 1991.

Stevens, M. P.; Humphrey, T. J.; Maskell, D. J. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**. 364:2709-2723. 2009.

Terra, N. N. **Apontamentos sobre tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Ed. UNISINOS, 1998.

Uzzau, S.; Brown, D. J.; Wallis, T.; Rubino, S.; Leori, G.; Bernard, S. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiology Infection**. 125:229-255. 2000.

Velge, P.; Cloeckert, A.; Barrow, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**. 36:267-288. 2005.

Velge, P.; Wiedemann, M.; Rosselin, M. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. **Microbiology Open**. 1(3):243-258. 2012.

6. RESULTADO

Os resultados encontram-se em forma de artigo, com o seguinte título: “Pesquisa de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* Diarreiogênicas em Linguiças”.

PESQUISA DE *Salmonella* spp. E *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS EM LINGUIÇAS

RESUMO

A prevenção da contaminação por microrganismos patogênicos é um dos principais desafios enfrentados na produção de embutidos cárneos. Pequenas indústrias da região de Londrina, Paraná, produzem embutidos que são comercializados em feiras livres, pequenos mercados, bares e restaurantes da cidade. Embora essas indústrias sejam fiscalizadas pela Vigilância Sanitária Municipal, não existem dados sobre microrganismos patogênicos presentes nesses produtos. Os objetivos deste estudo foram pesquisar a presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreiogênicas em amostras de linguiças produzidas e comercializadas na região de Londrina, Paraná, e identificar os genes de virulência *eae*, *bfp*, *stx1*, *stx2*, *hlyA*, *ipaH*, *elt*, *aggR*, *aap* e *AA probe* das cepas de *E. coli* isoladas dessas amostras. Quarenta e seis amostras de 3 tipos de linguiça (suína, toscana e calabresa) produzidas por 4 diferentes produtores (marcas A, B, C e D) foram analisadas, das quais 26,1% das amostras estavam contaminadas com *Salmonella* spp. e 33 (71,3%) com *E. coli*. Uma amostra de linguiça calabresa estava contaminada com *E. coli* que apresentava genes *eae* e *hlyA*. Os resultados obtidos sugerem possível contaminação da planta de processamento e/ou das matérias primas utilizadas na fabricação da linguiça. Os resultados obtidos indicam que um mau processamento industrial ou falhas de armazenamento, distribuição e/ou comercialização, além da falta das devidas instruções de preparo nas embalagens, podem resultar na comercialização e no consumo de embutidos cárneos contaminados.

Palavras-chave: carne suína, bactérias enteropatogênicas, genes de virulência

ABSTRACT

The prevention of pathogenic microorganisms contamination is one of the main challenges faced in the processed meat production. Small industries in the region of Londrina, Paraná, produce sausages that are commercialized in free fairs, small markets, bars and restaurants in the city. Although these industries are inspected by

the Municipal Sanitary Surveillance, there are no data about the pathogenic microorganisms present in these products. The objective of this study was to investigate the presence of *Salmonella* spp. and diarrheagenic *Escherichia coli* in sausages produced and sold in the region of Londrina, Paraná, and identify *eae*, *bfp*, *stx1*, *stx2*, *hlyA*, *ipaH*, *elt*, *aggR*, *aap* e *AA probe* genes in *E. coli* strains isolated from these samples. Forty six samples of three types of sausage (pork, tuscan and calabresa) produced by four different producers (brands A, B, C and D) were analysed. *Salmonella* spp. was isolated from 12 (26,1%) and *E. coli* from 33 (71,3%) of the analysed samples. One sample of calabresa sausage was contaminated with *E. coli* that carried *eae* and *hlyA* genes. The results suggest possible contamination from the processing plant and/or from the raw material used in the sausage manufacturing. The results indicate that a poor industrial processing or storage, distribution and/or commercialization failures, besides the lack of due preparation instructions in the packages, may result in the commercialization and consumption of contaminated processed meats.

Key words: pork meat, enteropathogenic bacteria, virulence genes

INTRODUÇÃO

A prevenção da contaminação por microrganismos patogênicos é um dos principais desafios enfrentados na produção de embutidos cárneos, uma vez que a presença de tais microrganismos nesse tipo de produto pode resultar tanto em doenças alimentares quanto em perdas econômicas aos seus produtores.

A atividade de água, o pH e os nutrientes disponíveis na carne crua favorecem o desenvolvimento de bactérias patogênicas. A manipulação da matéria prima e a higienização da planta de processamento inadequadas ou falhas no processamento, pós-processamento ou armazenamento de carnes e derivados podem levar à multiplicação de microrganismos causadores de doenças alimentares. Outro fator a considerar é a contaminação de ingredientes utilizados no preparo de embutidos, principalmente dos tipos produzidos sem cozimento. A contaminação presente nesses ingredientes pode persistir ou até mesmo aumentar durante o processamento e a comercialização (CABRAL, 2014).

Diversos estudos relatam o isolamento de *E. coli* diarreio gênicas e *Salmonella* spp. em carne suína e seus derivados (MÜRMAN et al., 2007; LIMA et al., 2011; CHARIMBA, HUGO & HUGO, 2012; RANTSIOU, ALESSANDRIA & COCOLIN, 2012; CABRAL et al., 2014). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, 6.848 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) foram notificados entre 2007 e 2016 no país, que resultaram em 121.283 doentes, dos quais 17.517 foram hospitalizados (14,5%), e 111 (0,09%) foram a óbito. Os principais agentes etiológicos responsáveis pelos surtos foram *Salmonella* spp. (7,3%), *Escherichia coli* (7,3%) e *Staphylococcus aureus* (5,7%). Na maior parte dos surtos relatados (66,9%), não houve a identificação do alimento que veiculou o microrganismo. Dentre os surtos com alimentos identificados (2.266 / 33,1%), os alimentos mistos foram a principal via de transmissão desses patógenos. Carne suína in natura, processados e miúdos foram responsáveis por 103 (4,5%) dos surtos relatados com alimentos identificados (BRASIL, 2016).

Salmonella spp. está amplamente distribuída na natureza e os produtos cárneos contaminados podem ser um risco à saúde pública. A infecção dos rebanhos de suínos por *Salmonella* spp. tende a ser um problema persistente nos sistemas de produção. Linfonodos submandibulares e tonsilas de suínos contaminados por *Salmonella* spp. podem permanecer na carcaça após o abate e juntamente com músculos da região da cabeça serem empregados na fabricação de embutidos (CASTAGNA et al., 2004a). A carne suína in natura de boa qualidade microbiológica é essencial para a inocuidade do produto acabado, assim como as condições higiênico-sanitárias utilizadas nas etapas de fabricação, transporte e armazenamento dos embutidos.

Sete grupos de *E. coli* diarreio gênicas são conhecidos: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), que inclui o subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogênica típica e atípica (EPECt e EPECa), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* aderente invasora (AIEC). Os principais genes utilizados na caracterização genética destes grupos são *stx1* e *stx2* (STEC), (EHEC), *eae* (EPECa), *eae* e *bfp* (EPECt), genes codificadores de enterotoxinas LT e ST e de fatores de colonização (ETEC), *ipaH* e *ial* (EIEC) e *aggR*, *aap* e *AA probe* (EAEC) (CROXEN et al., 2013). Os genes para a identificação genética de AIEC ainda não foram caracterizados e para DAEC não há consenso entre os autores

(NATARO & KAPER, 1998; CROXEN et al., 2013).

A importância de isolados de EAEC e EPEC, principalmente a EPEC atípica, como agentes de gastroenterite tem aumentado no Brasil (REGUA-MANGIA et al., 2004; FRANZOLIN et al., 2005; MORENO et al., 2010; LOZER et al., 2013; DIAS et al., 2016). Nos últimos anos, EPEC atípicas são mais frequentemente isoladas do que EPEC típicas, e da mesma forma que a *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC), são considerados patógenos emergentes (SCHMIDT, 2010).

O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína do mundo. Em 2015, foram produzidas aproximadamente 3,6 milhões de toneladas, das quais 15,2% foram exportadas. O consumo per capita anual foi de 15,1 kg. O Paraná é segundo maior estado produtor de carne suína no Brasil e foi responsável por 21% de total de suínos abatidos e por 12,1 % do total exportado no referido ano (ABPA, 2016).

Na região de Londrina, Paraná, há pequenas indústrias de embutidos que são comercializados em feiras livres, pequenos mercados, bares e restaurantes da cidade. A Vigilância Sanitária Municipal é o órgão responsável pela fiscalização dessas indústrias, porém não existem dados sobre microrganismos patogênicos presentes nesses produtos.

Os objetivos deste estudo foram pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em amostras de linguiças produzidas e comercializadas na região de Londrina, Paraná, e identificar os genes *eae*, *bfp*, *stx1*, *stx2*, *hlyA*, *ipaH*, *elt*, *aggR*, *aap* e *AA probe* em cepas de *E. coli* isoladas dessas amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Quarenta e seis amostras (46) de três tipos de linguiças (22 suínas, 17 toscanas e 7 calabresas), produzidas por 4 diferentes produtores da região de Londrina, Paraná, Brasil, foram adquiridas entre os meses de março e julho de 2015, em 4 estabelecimentos comerciais de Londrina.

Pesquisa de *Salmonella* spp.

Vinte e cinco gramas (25 g) de amostras foram homogeneizadas em

225 mL de água peptonada tamponada em *Stomacher* (Stomacher 400, Seward, Worthing, Inglaterra). Após a incubação a 35°C por 24 horas, alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL do enriquecimento não seletivo foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo Selenito Cistina (SC) e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia). O caldo SC foi incubado a 35°C e o caldo RV a 42°C por 24 horas. O ágar Hektoen e o ágar Xilose Lisina Desoxicolato de Sódio (XLD) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia) foram utilizados como meios seletivo-diferenciais, incubados a 35°C por 24 horas. Colônias características de *Salmonella* spp. foram submetidas à triagem bioquímica com utilização das provas de motilidade, produção de indol, descarboxilação de lisina e hidrólise de ureia. A confirmação do gênero foi realizada por meio da técnica de aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella* (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil).

Isolamento de *E. coli*

Vinte e cinco gramas (25 g) de amostra foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada. Alíquotas de 1 mL foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de caldo lauril sulfato de sódio (CLS) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia) e incubados a 35°C por 24 horas. Após a incubação, os tubos de CLS foram inoculados em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia) e incubados a 35°C por 24 horas. Colônias características lactose positiva e não produtoras de H₂S foram submetidas à triagem bioquímica, por meio das provas de indol, fermentação da glicose com produção de gás e utilização de citrato de sódio como única fonte de carbono. As colônias identificadas como *E. coli* foram armazenadas em ágar nutriente.

Extração do DNA das colônias de *E. coli* para uso nos ensaios PCR

Os isolados armazenados em ágar nutriente foram ressuspensos em solução salina estéril e cultivados em ágar MacConkey (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia). Após incubação a 35°C por 24 horas, uma alçada das colônias de cada placa de MacConkey foi ressuspensa em 200 µL de água estéril,

fervida em banho-maria por 10 minutos e centrifugada a 10000 *g* por 5 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas como DNA alvo para as reações de amplificação.

Cepas de referência utilizadas nos ensaios PCR

As cepas de *E. coli* diarreio gênicas utilizadas como controles positivos nos ensaios de PCR foram EHEC ATCC® 43889™ (*stx2+*, *eae+* e *hlyA+*), EPEC 2348/69 (*hlyA+*), EHEC H30 (*stx1+*), EIEC O152 (*ipaH+*), STLT (*elt+*), EAEC O42 (*aggR+*) e EPEC 2348 (*bfp+*). Como controle negativo foram utilizadas *E. coli* K12, Hb101 e DH5α.

Condições utilizadas nos ensaios de PCR para pesquisa de genes de virulência de *E. coli* diarreio gênicas

Para a detecção das *E. coli* diarreio gênicas foram utilizados os seguintes marcadores de virulência: *eae* (gene estrutural para intimina presente em EPEC e EHEC), *bfp* (gene estrutural para *bfp* presente em EPEC típica), *aggR* (ativador transcricional para AAFs de EAEC), *elt* e *est* (enterotoxinas de ETEC), *ipaH* (antígeno H do plasmídio de invasão encontrado em EIEC), *stx1* e *stx2* (toxinas Shiga de EHEC) e *hlyA* (enterohemolisina encontrada em EHEC). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas bem como o tamanho das sequências de DNA amplificadas estão descritos na tabela 1. Todas as reações de amplificação foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA).

A detecção dos genes de virulência *eae*, *stx1*, *stx2* e *hlyA* foi realizada por PCR Multiplex empregando os pares de iniciadores testados previamente por Paton & Paton (1998), com algumas modificações. A amplificação foi realizada utilizando 3 µL de DNA da amostra em 25 µL de mistura de reação contendo 1,5 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA), 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen®), 20 pmol/L de cada iniciador e água. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 15 ciclos a 95°C por 1 minuto, hibridação a 65°C por 2 minutos e polimerização da

sequência alvo a 72°C por 1,5 minutos; 20 ciclos a 94°C por 1 minuto, hibridação a 60°C por 2 minutos e polimerização da sequência alvo a 72°C por 2,5 minutos; e um ciclo final de polimerização a 72°C por 7 minutos. As amostras que apresentaram bandas suspeitas para *hlyA* foram confirmadas por ensaio de PCR uniplex utilizando-se esse único iniciador.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes de virulência de *E. coli* diarréiogênicas.

Genes	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Produto da PCR (pb)
<i>hlyA</i> ¹	(F) GCATCATCAAGCGTACGTTCC (R) AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534
<i>eae</i> ¹	(F) GACCCGGCACAAGCATAAGC (R) CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384
<i>stx1</i> ¹	(F) ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC (R) AGAACGCCCACTGAGATCATC	180
<i>stx2</i> ¹	(F) GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC (R) TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255
<i>elt</i> ²	(F) GGCGACAGATTATACCGTGC (R) CGGTCTCTATATTCCCTGTT	450
<i>ipaH</i> ²	(F) TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC (R) GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	600
<i>bfp</i> ²	(F) AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC (R) GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326
<i>aap</i> ³	(F) CTTGGGTATCAGCCTGAATG (R) AACCCATTCGGTTAGAGCAC	310
<i>aggR</i> ³	(F) CTAATTGTACAATCGATGTA (R) AGAGTCCATCTCTTTGATAAG	457
<i>AA probe</i> ³	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCAT (R) CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	629

¹ Paton & Paton, 1998; ² Aranda et al., 2004; ³ Cerna, Nataro & Estrada-Garcia, 2003.

A detecção dos genes de virulência *ipaH* e *elt* foi realizada por PCR Multiplex empregando os pares de iniciadores testados previamente por Aranda

(2004), com algumas modificações. A amplificação foi realizada utilizando-se 2,5 µL de DNA da amostra em 25 µL de mistura de reação contendo 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen®) e 20 pmol/L de cada iniciador. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; seguida de 40 ciclos a 95°C por 1 minuto, hibridação a 54°C por 2 minutos e polimerização da sequência alvo a 72°C por 1 minuto e polimerização da sequência alvo final por 7 minutos a 72°C.

A detecção dos genes de virulência *aap*, *aggR* e *AA probe* de EAEC foi realizada por PCR Multiplex empregando os pares de iniciadores testados previamente por Cerna, Nataro & Estrada-Garcia (2003), com algumas modificações. A amplificação foi realizada utilizando-se 2,5 µL de DNA da amostra em 20 µL de mistura de reação contendo 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen®), 10 pmol/L do primer *aap*, 15 pmol/L do primer *aggR* e 20 pmol/L do primer *AA probe*. As condições de amplificação foram: um ciclo inicial a 50°C por 2 minutos; desnaturação a 95°C por 3 minutos; 40 ciclos a 95°C por 40 segundos, a 59°C por 40 segundos e a 72°C por 40 segundos; polimerização da sequência alvo final a 72°C por 7 minutos.

A detecção do gene de virulência *bfp* foi realizada empregando os pares de iniciadores testados previamente por Aranda (2004), com algumas modificações. A amplificação do DNA da bactéria foi realizada com 2,5 µL de DNA da amostra em 25 µL de mistura de reação contendo 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen) e 20 pmol/L do primer *bpf*. As condições de amplificação foram: um ciclo inicial a 50°C por 2 minutos; desnaturação a 95°C por 3 minutos; 40 ciclos a 95°C por 40 segundos, a 59°C por 40 segundos e a 72°C por 40 segundos; polimerização da sequência alvo final a 72°C por 7 minutos.

Alíquotas de 10 µL de cada mistura de reação foram homogeneizadas com 1 µL de Gel Red 20 x (Biotium®, Hayward, CA, USA). A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 2% diluído em tampão Tris-Borato-EDTA 1x [Tris (Invitrogen®) 90 mM; ácido bórico (Nuclear, Diadema, São Paulo) 90 mM, EDTA (Nuclear) 2 mM], em cuba horizontal com o mesmo tampão a 70 V durante 1 hora e 40 minutos. Um marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen®)

foi utilizado em cada corrida. O gel foi visualizado em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia Molecular, Cotia, São Paulo, Brasil) e fotografado em sistema de fotodocumentação L.Pix Image Versão 1.21 (Loccus Biotecnologia Molecular).

RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho com a análise de 4 diferentes marcas de linguiça suína (n=22), toscana (n=17) e calabresa (n=7) estão apresentados na tabela 2. As marcas foram denominadas A, B, C e D. *Salmonella* spp. foi isolada em 12 (26,1%) amostras e *E. coli* em 33 (71,3%) amostras.

Tabela 2. Resultados das amostras de linguiça calabresa, suína e toscana que apresentaram contaminação por *E. coli* e *Salmonella* spp. por marca analisada.

Produtor (n° amostras analisadas)	Tipo de linguiça	N° de amostras	Amostras contaminadas com <i>E. coli</i>	Amostras contaminadas com <i>Salmonella</i>
A (n = 18)	Calabresa	2	0	0
	Suína	9	9	2
	Toscana	7	7	5
B (n = 18)	Calabresa	3	0	0
	Suína	10	10	2
	Toscana	5	2	1
C (n = 5)	Calabresa	0	0	0
	Suína	2	1	0
	Toscana	3	1	1
D (n = 5)	Calabresa	2	1 ^a	1
	Suína	1	1	0
	Toscana	2	1	1

^a Em uma das amostras foi isolada *E. coli* diarreio gênica que apresentava os genes *eae* e *hlyA*.

Das 12 amostras contaminadas com *Salmonella* spp., sete(58,3%) foram da marca A. A contaminação por *Salmonella* spp. foi maior nas amostras de linguiça toscana (8 de 17 / 41,7%), quando comparada com a contaminação encontrada nas amostras de linguiça suína (4 de 22 / 18,2%), independente da marca analisada. *E. coli* também foi isolada das 12 amostras contaminadas por

Salmonella spp. Das oito amostras de linguiça toscana contaminadas com *Salmonella*, cinco (62,5%) foram da marca A.

Todas as amostras de linguiça suína e toscana da marca A estavam contaminadas com *E. coli*. A marca A apresentou o maior número de amostras contaminadas com *Salmonella* spp. (58,3%) e *E. coli* (88,9%). Percentagem alta de contaminação por *E. coli* também foi observada nas linguiças suína e toscana da marca B (12 de 15 / 80,0%). O número de amostras das marcas C (n=5) e D (n=5) analisadas foi muito menor que os das marcas A (n=18) e B (n=18). No entanto, *E. coli* e *Salmonella* também foram isoladas de amostras de linguiça toscana e suína dessas duas marcas. Das sete amostras de linguiça calabresa analisadas, 2 da marca D estavam contaminadas com *Salmonella* spp. e uma estava contaminada com *E. coli*, que apresentava os genes *eae* e *hlyA* (figura 1).

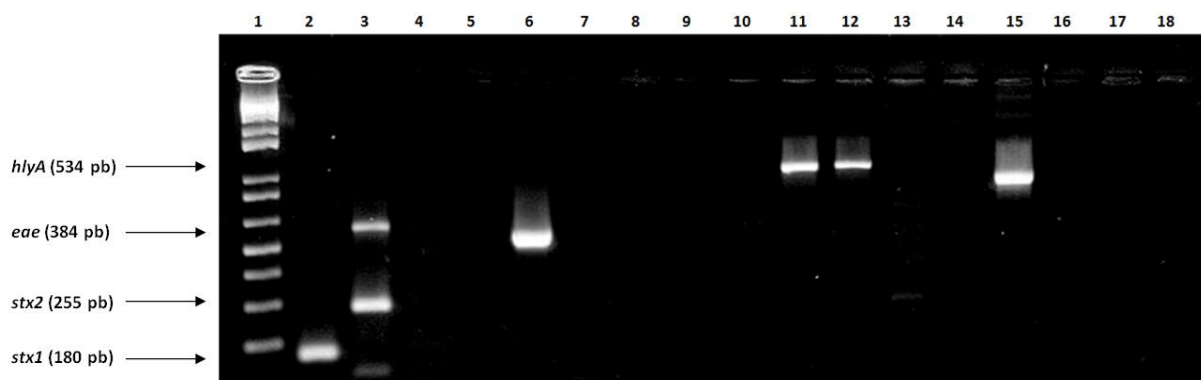


Figura 1. Resultado de PCR multiplex para detecção de genes *eae*, *stx1* e *stx2* e de PCR uniplex para detecção do gene *hlyA* de cepas de *E. coli* isoladas de amostras de linguiças. (1) Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen); (2) Controle positivo para *stx1* (EHEC H30); (3) Controle positivo para *stx2*, *eae* e *hlyA* (EHEC 43889); (4) Controle negativo (*E. coli* DH5 α); (5, 7, 8, 9 e 10) Amostras de *E. coli* negativas para os genes *eae* e *stx*; (6) Amostra de *E. coli* positiva para o gene *eae* isolada de linguiça calabresa da marca D; (11) EHEC 43889 (repetido para facilitar a leitura dos resultados); (12) Controle positivo para *hlyA* (EPEC 2348/69); (13) *E. coli* DH5 α (repetido para facilitar a leitura dos resultados); (14, 16, 17 e 18); Amostras negativas para o gene *hlyA*; (15) Amostra de *E. coli* positiva para o gene *hlyA* isolada de linguiça calabresa da marca D.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, *Salmonella* spp. foi detectada em 12 (26,1%) das 46 amostras de linguiça analisadas. Outros trabalhos realizados no sul do Brasil relataram frequências de isolamento semelhantes às encontradas no presente trabalho. Mürmann et al. (2009) e Souza et al. (2014) isolaram *Salmonella* spp. em 24,4% (84/336) e 30,0% (6/20) das amostras de linguiças tipo frescal comercializadas em Porto Alegre, Rio Grande do Sul e em Cascavel, Paraná, respectivamente. Pesquisas de *Salmonella* spp. realizadas com linguiça fresca na cidade de Niterói e Rio de Janeiro mostraram percentagens de contaminação superiores, que variaram de 37,0% (10/27) a 53,0% (58/91) (LIMA et al., 2011; CABRAL, et al., 2014). Percentagens de contaminação de carne suína e de embutidos mais elevadas também foram encontradas em trabalhos realizados na Alemanha (73,3%) (SINELL et al., 1990) e no México (88,3%) (ESCARTIN et al., 2000). Por outro lado, em algumas pesquisas realizadas no Brasil a contaminação de carne suína e embutidos foi muito inferior, com percentagens variando de 5,0 a 17,9 % (CHAVES et al., 2000; LOBO et al. 2001; SPRICIGO et al., 2008; BEZERRA et al., 2012).

A prevalência de *Salmonella* observada nas amostras da marca B parece estar relacionada à contaminação da carne suína in natura ou dos demais ingredientes utilizados na produção de alguns lotes. Duas amostras de linguiça suína e 1 de linguiça toscana, positivas para *Salmonella*, foram coletadas em um intervalo de 4 meses. *Salmonella* spp. não foi isolada das amostras coletadas no período intermediário. No entanto, é preciso ressaltar que *E. coli* foi isolada em 12 das 15 amostras de linguiça suína e toscana desta mesma marca, indicando possíveis condições higiênico-sanitárias de processamento inadequadas.

Em um estudo conduzido por Lima et al. (2011), 33% das amostras de linguiças suína apresentavam contaminação por *Salmonella* na porção interna enquanto que em 11% das amostras a contaminação era superficial. Esses resultados indicaram que a contaminação, provavelmente, tenha ocorrido devido à utilização de matéria prima contaminada com *Salmonella*. Em um outro estudo conduzido por Cabral et al. (2014), não houve diferença estatística da contaminação por *Salmonella* de linguiças analisadas em suas embalagens originais, em

comparação àquelas reembaladas pelo próprio mercado ou vendidas a granel diretamente ao consumidor. Esses autores sugeriram que a manipulação do alimento e seu armazenamento nos estabelecimentos de venda a varejo parecem exercer um papel secundário na contaminação das linguiças e que a causa principal da contaminação desse produto é a matéria prima contaminada.

A infecção dos rebanhos de suínos por *Salmonella* spp. tende a ser um problema persistente nos sistemas de produção. Castagna et al. (2004b) relataram um alto índice de suínos portadores de *Salmonella* spp. em linfonodos submandibulares e tonsilas, os quais podem permanecer na carcaça após o abate e, juntamente com músculos da região da cabeça, são empregados na fabricação de embutidos e carne mecanicamente separada. Esses ingredientes, se estiverem contaminados, podem ser diretamente responsáveis pela presença de *Salmonella* nesses produtos. A retirada das tonsilas da carcaça após o abate não elimina o risco de contaminação, mas pode diminuí-lo em cerca de 30%. Em relação aos linfonodos submandibulares, a retirada durante o processamento é dificultada por estarem firmemente aderidos à musculatura da cabeça (CASTAGNA et al., 2004a).

A percentagem de contaminação de 12,6% da carne suína produzida em Portugal é muito superior à percentagem de 0,7% da União Europeia. Esta diferença na contaminação pode ser devido ao fato de que Portugal, embora tenha um sistema de monitoramento de contaminação de carne suína por *Salmonella*, não tem um programa nacional de controle de *Salmonella* na produção primária. Como a contaminação cruzada durante o abate é a forma mais comum de contaminação da carne suína e derivados, estratégias de controle devem ser implementadas nas granjas para a diminuição da contaminação do produto final (XAVIER et al., 2014).

A maior frequência de isolamento de *Salmonella* no presente trabalho foi na linguiça toscana da marca A (71,4%). A coleta das amostras foi realizada em um período de três meses, o que sugere uma possível contaminação da planta de processamento e não apenas contaminação de um único lote do produto. Duas das 9 amostras de linguiça do tipo suína dessa mesma marca também foram positivas para *Salmonella*.

É praticamente impossível evitar a contaminação cruzada de carcaças quando animais contaminados entram na linha de produção de embutidos e, portanto a contaminação do produto final parece ser superior à encontrada nos

animais. Segundo Berends et al. (1998), medidas de sanitização e boas práticas de fabricação contribuíram com não mais que 10% de redução dos índices de contaminação do produto final e a disseminação da contaminação ocorreu durante o corte, a desossa e a moagem. Berends et al (1998) também estimaram a ocorrência de *Salmonella* spp. entre 5 e 40% nos cortes suínos, enquanto que em embutidos, a percentagem chegou a 70%.

A qualidade da matéria prima in natura é essencial para a segurança microbiológica do produto acabado, porém as etapas de secagem e maturação são capazes de reduzir, minimizar ou até mesmo eliminar *Salmonella* spp. A fabricação de linguiça combina o uso de sais de cura, a microbiota natural presente nas linguiças fermentadas e a duração do tempo de secagem e maturação para a obtenção de um produto seguro. A queda do potencial de oxi-redução, da atividade de água e do pH são capazes de inibir a multiplicação bacteriana (FONTANA, 2005).

Alban et al. (2002) encontraram contaminação de <50 a 400 UFC de *Salmonella* spp./cm² na superfície da carcaça suína, com redução de 2 a 3 log durante o processamento da linguiça. Mataragas et al. (2015) constatou que *Salmonella enterica* pode ser reduzida em 1 log ou mais durante o processamento, nos qual ocorrem alterações de pH e de atividade de água. A inibição da multiplicação ocorre em valores de pH inferiores a 5.3 e portanto, o tempo e a temperatura em que a carne crua permanece em pH superior a 5.3 são críticos (LUCKE, 2000; ICMSF, 2005). Embora a diminuição da contaminação durante o processamento de linguiças possa ocorrer, no Brasil, Mürmann et al. (2007) encontraram uma contagem que variou de 0,03 NMP g⁻¹ a 460 NMP g⁻¹ e Spricigo et al. (2008) relataram contagens variando de < 3 NMP g⁻¹ a 460 NMP g⁻¹ nas 54 amostras positivas analisadas, com uma dessas amostras apresentando contagem superior a 1.100 NMP g⁻¹. A legislação brasileira estabelece que *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25 g da amostra analisada (Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

A percentagem de contaminação por *E. coli* das linguiças analisadas neste trabalho foi de 71,3% (n = 33). Alguns trabalhos realizados no Brasil também relataram alta percentagem de contaminação. Estudos realizados com linguiça frescal suína no Rio Grande do Sul e Goiás mostraram percentagens de contaminação por *E. coli* de 88,9% e 75,0 %, respectivamente (GIEHL et al., 2010; GEORGES, 2015).

Nenhum dos isolados de *E. coli* analisados neste trabalho apresentou genes de virulência utilizados na caracterização genética de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC) ou produtora de toxina Shiga (STEC). Os genes *eae* e *hlyA* foram detectados em uma das amostras de linguiça calabresa da marca D (fig. 1). Outros autores encontraram prevalência de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) em carne suína. Lee et al. (2009) detectaram DEC em 9% das amostras de carne suína comercializadas na China. Borges (2011) detectou 14% de EPEC, 4,7% de STEC e 0,9% de EHEC em carcaças de suínos abatidos na região de Ribeirão Preto, SP.

Isolados de EPEC são classificados como típicos se possuem, além do gene *eae*, o plasmídeo fator de aderência (EAF) e o gene *bfp*. Isolados de *E. coli* que não possuem o plasmídeo EAF são classificados como EPEC atípica (TRABULSI, 2002). A prevalência das infecções provocadas por EPEC variam consideravelmente de acordo com faixa etária, condição sócio-econômica e região geográfica das populações estudadas. Porém, a falta de diferenciação entre EPEC atípica e típica em alguns estudos dificultam esse entendimento. Isolados de EPEC sempre tiveram forte associação com diarreia infantil, no entanto estudos recentes têm demonstrado uma mudança nessa epidemiologia (GOMES et al., 2016). Isolados de EPEC atípica eram mais frequentes como causa de gastroenterite quando comparados a EPEC típica, e da mesma forma que a *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC), eram considerados patógenos emergentes (GOMES et al., 2004; SCHMIDT, 2010). Porém, outros estudos ainda relatam que EPEC típicas são mais frequentes que atípicas como causa de diarreia (GOMES et al., 2016).

Um fato interessante a ser mencionado é que os sorogrupos de EPEC atípica diferem daqueles da EPEC típica, indicando que poucos isolados de EPEC atípica possam ser isolados de EPEC que perderam o plasmídeo EAF (SCHMIDT, 2010). Ao contrário das EPEC típicas, muitos isolados de EPEC atípica são encontrados em diversas espécies de animais, doentes ou saudáveis. Recentemente, Borges et al. (2016) isolaram EPEC (típica e atípica) e STEC em aves selvagens e pombos urbanos na cidade de São Paulo. Apesar de não se ter conhecimento a respeito da patogenia da transmissão da doença de animais para humanos, acredita-se que alguns isolados de EPEC sejam potenciais patógenos causadores de zoonoses, o que pode levar à contaminação de carne crua, leite e

água, que veicularão a doença causando infecção em humanos (GOMES et al., 2016).

A frequência de EAEC e EPEC atípica isoladas de pacientes com gastroenterite foi demonstrada em diversos estudos (GOMES et al., 2004; LIEBCHEN et al., 2011). Araujo et al. (2007) isolaram EAEC e EPEC atípica em 8,9% e 5,4% dos casos analisados de diarreia em crianças na cidade de São Paulo, respectivamente. Estudo recente de Assis et al. (2014) relatou que a prevalência de EPEC atípica e típica isoladas de casos de diarreia no estado do Paraná, Brasil, foi de 3,3% e 0,25%, respectivamente. Lozer et al. (2010) analisaram amostras clínicas de crianças com diarreia na região sudeste do Brasil e detectaram 8,7% de EPEC atípica e 0,5% de EPEC típica. Estudos similares foram conduzidos na Colômbia (RUGÉLES et al., 2010), Venezuela (HANNAOUI et al., 2010) e Peru (OCHOA et al., 2009).

Neste estudo, foi isolada em uma das amostras de linguiça calabresa *E. coli* apresentando os genes *eae* e *hlyA*, porém sem o gene *stx*. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é um subtipo de STEC, que apresenta o gene *hlyA* e também pode apresentar o locus LEE (*enterocyte effacement*), que é responsável pela adesão característica denominada de A/E (*attaching and effacing*) (CROXEN et al., 2013). O sorotipo mais comum de EHEC é o O157:H7, mas outros seis sorogrupos também são frequentemente isolados (O26, O45, O103, O111, O121 e O145) (CROXEN et al., 2013). Segundo Bielaszewska et al. (2007), isolados de STEC podem perder os genes *stx* durante a infecção, isolamento ou sub-cultivo. Assim sendo, será necessária a realização de sorotipagem e a determinação de outras características genotípicas e fenotípicas para a determinação do grupo patogênico desta cepa de *E. coli* (*eae+*, *hlyA+*, *stx-*) isolada de uma das amostras de linguiça calabresa.

Algumas precauções podem ser tomadas para reduzir a incidência de *E. coli* diarreiogênicas na produção primária e nas indústrias de processamento de alimentos. Procedimentos de higiene e a implantação do sistema Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) durante o abate e a produção de derivados devem ser rigidamente aplicados. *E. coli* O157, por exemplo, pode não ser completamente eliminada durante os processos de cura de produtos cárneos. Além disso, como a dose infectante é baixa (<50 UFC), o consumo de produtos cárneos sem processamento térmico pode ser um risco à saúde da população (TILDEN et

al., 1996). Roccato et al. (2017), no entanto, observaram que lotes de linguiça contaminadas por *E. coli* O157 após a mistura da carne crua com os demais ingredientes mostraram-se negativos para essa bactéria no produto final, reforçando a eficácia de um processamento adequado na redução ou eliminação de bactérias patogênicas. Por outro lado, alguns aspectos do processo de produção de linguiças podem aumentar o risco de contaminação por *E. coli*. Um estudo conduzido em linguiças fermentadas produzidas na Suécia indicou que a inoculação da cultura *starter* em estado dormente (seca e congelada) atrasava o início da fermentação, propiciando uma proliferação inicial de EHEC. Além disso, a ausência de tratamento térmico e o curto período de cura a que o produto era submetido (aproximadamente 1 semana) facilitavam a sobrevivência de *E. coli* O157, que é ácido-resistente (SARTZ et al., 2008).

Algumas marcas de linguiças calabresas sofrem um processo de cozimento durante sua produção, possibilitando seu consumo sem processamento térmico prévio. As linguiças do tipo toscana e suína, no entanto, são cruas e costumam ser assadas em fornos convencionais, churrasqueiras, ou preparadas em grills ou fritura de imersão. O risco que este produto pode vir a representar, portanto, estaria mais relacionado à contaminação cruzada que pode ocorrer com a transferência desse microrganismo para outros alimentos, principalmente aqueles ingeridos crus (ESCARTIN, LOZANO & GARCIA, 2000; GORNAN, BLOMFIELD & ADLEY, 2002).

A padronização e o controle de todas as etapas do processo são cruciais para a produção de um alimento livre de contaminação. O excesso de manipulação, a higienização inadequada dos instrumentos e equipamentos, a ausência ou deficiência das boas práticas de fabricação e do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle refletem na qualidade higiênico-sanitária desse tipo de alimento. Além disso, a falta de devidas instruções de preparo pode levar a contaminações cruzadas e o consumo de produtos contaminados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual ABPA 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>. Acesso em: 12 de janeiro do 2017.

Alban, L.; Olsen, A. M.; Nielsen, B.; Sorensen, R.; Jessen, B. Qualitative and quantitative risk assessment for human salmonellosis due to multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT 104 from consumption of Danish dry-cured pork sausages. **Preventive Veterinary Medicine**. 52: 251-265. 2002.

Aranda, K. R.; Fagundes-Neto, U.; Scaletsky, I. C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. 42(12): 5849-5853. 2004.

Araujo, J. M.; Tabarelli, G. F.; Aranda, K. R. S.; Fabbriotti, U. F.; Mendes, C. M. F.; Scaletsky, I. C. A. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**. 45(10):3396-3399. 2007.

Bezerra, M.V.P.; Abrantes, M.R.; Silvestre, M.K.S.; Sousa, E.S.; Rocha, M.O.C.; Faustino, J.G.; Silva, J.B.A. Avaliação microbiológica e físico-química de linguiça toscana no Município de Mossoró, RN. **Arquivos do Instituto Biológico**. 79(2):297-300. 2012.

Berends, B. R; van Knapen, F.; Mossel, D. A. A.; Burt, S. A.; Snijders, J. M. A. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. **International Journal of Food Microbiology**. 44: 219-229. 1998.

Bielaszewska, M; Prager, R.; Köck, R.; Mellmann, A.; Zhang, W.; Tschäpe, H.; Tarr, P.I.; Karch, H. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. **Applied and Environmental Microbiology**. 73:3144–3150. 2007.

Borges, C. A. **Detecção de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em carcaças e fezes de suínos abatidos na região de Ribeirão Preto – SP e perfil de susceptibilidade dos isolados frente a diferentes antimicrobianos.** Jaboticabal, 2011 vi, 43 f. : il. ; 28 cm Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

Borges, C. A.; Cardozo, M. V.; Beraldo, L. G.; Oliveira, E. S.; Maluta, R. P.; Barboza, K. B.; Werther, K.; Ávila, F. A. Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic *Escherichia coli* with zoonotic potential. **Journal of Microbiology.** 2017. DOI 10.1007/s12275-017-6523-3

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Dezembro de 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/09/Apresentacao-Surtos-DTA-2016.pdf>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

Cabral, C.C.; Conte-Junior, C.A.; Silva, J. T.; Paschoalin, V. M. F. *Salmonella* spp. contamination in fresh pork and chicken sausages marketed in Niterói and Rio de Janeiro, Brazil. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.** 9:243-249. 2014.

Castagna, S. M. F.; Schwarz, P.; Canal, C. W.; Cardoso, M. R. I. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae.** 32(2):141-147. 2004a.

Castagna, S. M. F.; Schwarz, P.; Canal, C. W.; Cardoso, M. Presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** 56(3):300-306. 2004b.

Cerna, J.F.;Nataro, J.P.; Estrada-Garcia, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology.** 41(5):2138-2140. 2003.

Charimba, G.; Hugo, C.; Hugo, A. The incidence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in minced beef and boerewors. **Food Research International**. 47: 353-358. 2012.

Chaves, G. M. C.; Gonçalves, P. M. R.; Franco, R. M.; Carvalho, J. C. A. P. Avaliação bacteriológica de lingüiça frescal suína comercializada no Município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**. 4:48-52. 2000.

Croxen, M.; Law, R.; Scholz, R.; Keeney, K.; Wlodarska, M.; Finlay, B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. 26(4):823-880. 2013.

Dias, R.C.; dos Santos, B.C.; dos Santos, L.F.; Vieira, M.A.; Yamatogi, R.S.; Mondelli, A.L.; Sadatsune, T.; Sforcin, J.M.; Gomes, T.A.; Hernandez, R.T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E.coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **APMIS: acta pathologica, microbiologia, et immunologica Scandinavica**. 124(4):299-308. 2016.

Escartín, E. F.; Castilho, A.; Hinijosa-Puga, A.; Saldaña-Lozano, J. Prevalence of *Salmonella* in churizo and its survival under different storage temperatures. **Food Microbiology**. 16: 479-486. 1999.

Fontana, C.; Sandro Coconcelli, P.; Vignolo, G. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. **International Journal of Food Microbiology**. 103(2):131-142. 2005.

Franzolin, M.R.; Alves, R.C.; Keller, R.; Gomes, T.A.; Beutin, L.; Barreto, M.L.; Milroy, C.; Strina, A.; Ribeiro, H.; Trabulsi, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 100(4):359-363. 2005.

Georges, S.O. **Qualidade microbiológica de lingüiças do tipo frescal e caracterização de isolados de *Escherichia coli***. Dissertação de Mestrado

apresentada ao programa de Pós-graduação em Nutrição e Saúde da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.

Giehl, Z.G.; Klahr, G. T.; Martins, A.P.; Zocche, F.; Brum, L.P.; Rosa, C.S. Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em linguças frescas comercializadas em Dom Pedrito, RS. **Anais Do VII Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade Federal Do Pampa.** Alegrete, Rio Grande do Sul. 2015.

Gomes, T.; Irino, K.; Girão, D. M.; Girão, V. B .C.; Guth, B. E.C.; Vaz, T. M. I.; Moreira, F. C.; Chinarelli, S. H.; Vieira, M. A. M.: Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerging Infectious Diseases.** 10:1851-1855. 2004.

Gomes, T.A.T.; Elias, W. P.; Scaletsky, I.C.A.; Guth, B.E.C.; Rodrigues, J.F.; Piazza,, R.M.F.; Ferreira, L.C.S.; Martinez, B.M. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology.** 47S:3-30. 2016.

Hannaoui, E.; Villalobos, L.; Martínez, R.; Maldonado, A.; Bastardo, J.; Hagel, I. Diarrheagenic *Escherichia coli* associated with acute diarrhea in children of cumana, Venezuela. **Investigacion Clinica.** 51(4):489-500. 2010.

ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 6. **Microbial Ecology of Food Commodities** (2nd edition). New York: Kluwer Academic (Chapter 1). 2005.

Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews.** 2:123-140. 2004.

Lee, G.Y.; Jang, H.I.; Hwang, I.G.; Rhee, M.S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology.** 134:196-200. 2009.

Liebchen, A.; Benz, I.; Mellmann, A.; Karch, H.; Gomes, T. A. T.; Yamamoto, D.; Hernandez, R. T.; Sampaio, J.; Sampaio, S. C. F.; Fruth, A.; Schmidt, M. A. Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Diarrhea in

São Paulo, Brazil: Identification of Intermediate Virulence Factor Profiles by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. 49(6):2274–2278. 2011.

Lima, B. R. C. C.; Canto, A. C. V. C. S.; Nascimento, R. S.; Franco, R. M.; Nascimento, E. R. Prevalência de *Salmonella* spp. na superfície e no interior de linguiça frescal suína comercializada no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 33(3):133-136. 2011.

Lobo, M. V.; Ugalde, M. G.; Fries, L. L. M.; Kubota, E. H. Avaliação microbiológica de salames coloniais comercializados no Município de Santa Maria-RS. **Higiene Alimentar**. 15: 57-61. 2001.

Lozer, D.; Souza, T. B.; Monfardini, M. V.; Vicentini, F.; Kitagawa, S. S.; Scaletsky, I. C.; Spano, L. C. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infectious Diseases**. 13(1):1471-2334. 2013.

Lucke, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**. 56:105-115. 2000.

Mataragas, M.; Bellio, A.; Rovetto, F.; Astegiano, S.; Decastelli, L.; Cocolin, L. Risk-based control of food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the Italian fermented sausages Cacciatore and Felino. **Meat Science**. 103:39-45. 2015.

Moreno, A.C.;Filho, A.F.;Gomes Tdo, A.;Ramos, S.T.; Montemor, L.P.;Tavares, V.C.;Filho Ldos, S.; Irino, K.; Martinez, M.B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 66(1):50-57. 2010.

Mürmann, L; Santos, M.C.M.; Cardoso, M. Curvas de crescimento e destruição termica de serovares de *Salmonella* spp. isolados de linguiça frescal de carne suína. **Acta Scientiae Veterinariae**. 37(4):329-335. 2007.

Mürmann, M.C.S. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**. 20(3):191-195. 2009.

Nataro, J. P; Kaper, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**. 11:142-201.1998.

Ochoa, T.J.; Ruiz, J.; Molina, M.; Del Valle, L.J.; Vargas, M. Gil, A.I.; Ecker, L., Barletta, F., Hall, E.; Cleary, T.G.; Lanata, C.F. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheogenic *Escherichia coli* in infants in Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 81:296-301. 2009.

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**. 36(2):598-602. 1998.

Rantsiou, K.; Alessandria, V.; Cocolin, L. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food products of animal origin as determined by molecular methods. **International Journal of Food Microbiology**. 154:37-43. 2012.

Regua-Mangia, A.H.; Gomes, T.A.; Vieira, M.A.; Andrade, J.R.; Irino, K.; Teixeira, L.M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhea in Rio de Janeiro. **Journal of Infection**. 48(2):161-167. 2004.

Roccatò, A.; Uyttendaele, M.; Barrucci, F.; Cibin, V.; Favretti, M.; Cereser, A.; Dal Cin, M.; Pezzuto, A.; Piovesana, A.; Longo, A.; Ramon, E.; De Rui, S.; Ricci, A. Artisanal Italian salami and sopresse: Identification of control strategies to manage microbiological hazards. **Food Microbiology**. 61:5-13. 2017.

Rúgeles, L. C.; Bai, J.; Martínez, A. J.; Vanegas, M. C.; Gómez-Duarte, O. G. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. **The Journal of Infection in Developing**

Countries. 8(12):1609-1614. 2010.

Sartz, L.; De Jong, B.; Hjertqvist, M.; Plym-Forsell, L.; Alsterlund, R.; Löfdahl, S.; Osterman, B.; Ståhl, A.; Eriksson, E.; Hansson, H.B.; Karpman, D. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. **Epidemiology Infection.** 136:370-380. 2008.

Schmidt, M. A. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. **Cellular Microbiology.** 12:1544-1552. 2010.

Sinell, H.J.; Pietzsch, O.; Klingbeil, H.; Benner, M. Estimation of most probable number of *Salmonella* in retail samples of miced pork. **International Journal of Food Microbiology.** 11:135-142. 1990.

Souza, M.; Pinto, F. G. S.; Bona, E. A. M.; Moura, A. C. Qualidade higiênico-sanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguiças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico.** 81(2):107-112. 2014.

Spricio, D.A.; Matsumoto, S.R.; Espíndola, M.L.; Vaz, E.K.; Ferraz, S.M. Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguiças suínas tipo frescal em Lages, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** 60(2):517-520. 2008.

Tilden, J. Jr.; Young, W.; McNamara, A.M.; Custer, C.; Boesel, B.; Lambert-Fair, M.A.; Majkowski, J.; Vugia, D.; Werner, S.B.; Hollingsworth, J.; Morris, J. G. Jr. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. **American Journal of Public Health.** 86:1142-1145. 1996.

Trabulsi, L.R., Keller, R., Gomes, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases.** 8(5):508-513. 2002.

Xavier,C.; Gonzales-Barron, U.; Paula, V.; Estevinho,L.; Cadavez, V. Meta-analysis of the incidence of foodborne pathogens in Portuguese meats and their products. **Food Research International**. 55:311-323. 2014.