

# VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE DE CEPAS DE *Escherichia coli* PATOGENICAS EM LINGÜIÇA SUÍNA TIPO TOSCANA

FRANCO, R.M.<sup>1</sup>; MANTILLA, S.P.S.<sup>2</sup>; GOUVÊA, R.<sup>3</sup>; ALMEIDA, G. S.<sup>4\*</sup>; OLIVEIRA, L.A.T.<sup>1</sup>

## Resumo

A presença de *Escherichia coli* patogências em alimentos caracteriza um perigo em potencial para a saúde coletiva, visto que este microrganismo é capaz de ocasionar surtos de enfermidades transmitidas por alimentos e até mesmo levar o consumidor a óbito dependendo do sorogrupo envolvido. A espécie bacteriana denominada *Escherichia coli* é um bastonete Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Sua presença nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogênicos. Como patógeno transmitido por alimentos adquire novo significado, podendo ocasionar a colite hemorrágica. Embora a epidemiologia das cepas EHEC não esteja completamente estabelecida, os indivíduos com faixa de idades extremas, crianças menores de cinco anos e idosos, são mais sensíveis. Neste experimento objetivou-se verificar a viabilidade de cepas de *E. coli* pertencentes aos sorogrupos EPEC, EIEC e EHEC isolados de diferentes amostras de suínos em lingüiça suína frescal tipo toscana para evidenciar a capacidade de desenvolvimento deste patógeno em alimentos. Todos os sorogrupos analisados apresentaram viabilidade neste produto, constatando a importância da manipulação adequada da carne de suíno durante processamento da mesma para que não ocorram contaminações da carcaça com *E. coli* patogências, visto que esta bactéria tem condições de se desenvolver neste alimento tornando-o impróprio para o consumo.

Palavras-chave: carne suína, patógenos, embutidos

## Introdução

A espécie bacteriana denominada *Escherichia coli* é um bastonete Gram negativo, não esporulado, oxidase negativa, móvel por flagelos peritríquios ou não móvel, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases, pertencente à família *Enterobacteriaceae*.

As cepas de *Escherichia coli* são importantes como possíveis patógenos transmitidos por alimentos, se encontram nas fezes e em geral têm ampla distribuição, embora em pequenas quantidades, nos ambientes onde se encontram os alimentos. Como microrganismo indicador, a presença de *Escherichia coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de

---

<sup>1</sup> Médico Veterinário, Doutor, Professor do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Fluminense (UFF)

<sup>2</sup> Aluna de Doutorado do curso de Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal (POA) da UFF

<sup>3</sup> Aluna de Mestrado do curso de Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de POA da UFF

<sup>4</sup> Aluno de Graduação em Medicina Veterinária da UFF

contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogênicos. Como microrganismo potencialmente patogênico transmitido por alimentos a reduzidas quantidades, geralmente aceitáveis, adquirem novo significado, em especial quando as condições do meio em que se encontra permitem sua multiplicação.

A susceptibilidade à infecção por *Escherichia coli* segue o exemplo habitual da idade, onde jovens e indivíduos susceptíveis às infecções sofrem grandes riscos. Infecções devidas às cepas de EPEC e ETEC são particularmente comuns na infância (CDC, 2000) e sorotipos clássicos de EPEC usualmente associados somente com infecções em crianças com menos de 18 meses de idade. Nesta faixa etária, existe evidência de que o sexo masculino é mais susceptível que o sexo feminino (Antai e Anozie, 1987). As infecções por ETEC são somente, raramente, encontradas em áreas onde as infecções por EPEC estão presentes. Isto é provavelmente devido à competição pelos dois microrganismos pelos mesmos sítios de ligação intestinal.

Muitos autores pesquisaram coliformes em carnes suínas como Calderon e Furlanetto (1990), Fuzihara e Franco (1993), Martins et al. (1993), Oliveira et al. (1996), Franco e Chaves (1997), Martins et al. (1997) e Pinto et al. (1999).

### **Material e Métodos**

A matéria-prima para a fabricação da lingüiça toscana foi obtida em abatedouro frigorífico de suínos abatidos na área do Grande Rio, sob a Inspeção Estadual, clinicamente saudáveis e julgados aptos para o consumo após inspeção "ante e post - mortem", e provenientes dos estados do Rio de Janeiro (Magé e Rio Bonito), Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina.

A massa usada teve a seguinte formulação para a lingüiça suína frescal tipo toscana: carne suína (82,45%), papada (14,60%), sal (2,41%), açúcar (0,095%), alho (0,19%), pimenta do reino preta (0,24%) e eritorbato de sódio (0,025%).

No processamento de produção, a matéria prima foi moída em disco com 12mm de diâmetro, seguida de pesagem e misturada por uma hora. Procedeu-se ao embutimento em tripa natural isenta de contaminação, formando-se gomos de  $\pm$  15cm, pesando de 30 - 40 gramas. Os gomos foram amarrados com barbante esterilizado para minimizar as variáveis contaminantes.

Antes da contaminação experimental do embutido com as cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de carne suína da região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria; cavidade torácica entre 4ª e 7ª costelas (pleura e músculos intercostais); cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda), linfonodos mesentéricos; e fezes da região íleo-ceco-cólica de suínos escolhidos aleatoriamente, abatidos na área do Grande Rio, em abatedouro frigorífico, sob a Inspeção Estadual, sorotipadas e estocadas (EPEC - B O125, EPEC - C O86, EPEC - C O126, EPEC - C O128, EIEC - A 029, EHEC - O 157), o produto foi analisado com vista à eventual presença deste microrganismo, seguindo-se as metodologias descritas a seguir.

O isolamento e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) e *Escherichia coli* O157:H7 foi realizada de acordo com Merck (1996). Os subcultivos foram selecionados em meio SIM com incubação a 35 - 37°C por 24 - 48h para verificar-se a produção de sulfeto (H<sub>2</sub>S), indol, motilidade; sendo separados os cultivos que apresentaram a formação de H<sub>2</sub>S, considerando-se suspeitos de serem *Escherichia coli* aqueles que foram H<sub>2</sub>S negativo, indol positivo, motilidade positiva

ou negativa (Krieg et al., 1984). Os isolamentos com este perfil foram identificados após incubação à 35 - 37°C por 24 - 48h conforme descrito por Toledo et al. (1982, a, b), empregando-se os meios de cultura EPM, MILI e Ágar Citrato de Simmons. Em conformidade com Krieg et al. (1984), foram procedidas ainda as provas bioquímicas complementares.

As colônias que apresentaram as características típicas de *E. coli* foram sorotipadas. Para a soroaglutinação em placa com anti-soros poli e monovalentes seguiu-se a metodologia descrita por Ewing (1986). A confirmação bioquímica dos isolados foi verificada pelo sistema API20 E utilizado conforme especificação do fabricante.

A Pesquisa de colônias de *Escherichia coli* enteropatogênica seguiu a metodologia descrita por Mehlman e Lovett (1984) com modificações.

Durante a realização deste experimento, o produto foi mantido congelado. Constatada a ausência do microrganismo em questão, o embutido foi descongelado tecnologicamente procedendo-se à sua contaminação com as estirpes isoladas e estocadas.

O preparo das suspensões bacterianas para inoculação no produto, foi assim seqüenciado: as cepas estocadas foram semeadas em Ágar Caso inclinado incubado à 35°C por 18-24 horas que foram suspensas em SFT de Butterfield e o número de células bacterianas por mililitro, padronizado, através do "The International Reference of Opacity" de forma a obter-se a concentração de  $10^{10}$  células por mililitro. As suspensões padrões foram diluídas sucessivamente em SFT de Butterfield, com o intuito de obter-se concentrações aproximadas de  $10^2$  a  $10^3$  bactérias por mililitro, complementadas com a técnica de contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, para demonstração do número de células viáveis nos inóculos. Estas diluições passaram a constituir as suspensões contaminantes para o produto.

Cada gomo foi inoculado, separadamente, com cada uma das cepas, perfazendo um total de 24 gomos e seis cepas, com 3 mL de cada uma das suspensões ( $10^2$ ,  $10^3$ ) (respeitando-se a proporção de 500 gramas de massa para 50 mL de inóculo) utilizando-se seringas esterilizadas, cujas inoculações foram feitas nas extremidades e na parte mediana de cada gomo para distribuição mais uniforme. Em seguida os gomos inoculados, foram acondicionados separadamente em sacos de "stomacher" esterilizados ou sacos "plastistéril", lacrados e estocados em refrigeração, de 4°C, controlada rigorosamente com termômetro de máxima e mínima, observando o mesmo nível encontrado no comércio varejista por um, dois, quatro e sete dias.

Paralelamente, às amostras de embutidos (lingüiça toscana) inoculadas com os cultivos, foram mantidas, nas mesmas condições, unidades dos embutidos sem prévia inoculação (controle negativo) para observar-se as alterações de cor e odor em função do prazo de vida comercial, sendo as amostras analisadas quanto a estes aspectos no 1º, 2º, 4º e 7º dias de manutenção a 4°C, comparando-as com as amostras inoculadas.

Em cada um dos intervalos do armazenamento, procedeu-se a análise bacteriológica dos gomos inoculados, com as duas diluições, na tentativa de reisolar-se e identificar-se as cepas de *Escherichia coli* inoculadas, conforme descrito previamente.

## Resultados e Discussão

Nos experimentos realizados na segunda fase, os sorogrupos inoculados foram recuperados em todas as concentrações nos diferentes períodos de armazenamento e nas condições de frigorificação.

Quando aplicada à metodologia de isolamento e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) e *Escherichia coli* O157:H7, todos os sorogrupos testados foram recuperados e apresentaram no plaqueamento colônias esverdeadas, embora MUG positivas, comportamento bioquímico e sorológico idêntico ao primo isolamento.

Ao aplicar-se a metodologia da pesquisa de colônias de *Escherichia coli* enteropatogênica, nas sementeira direta, todos os sorogrupos foram recuperados, só não ocorrendo crescimento no meio ágar TC-SMAC. Nos demais meios as colônias foram características, entretanto no ágar *Escherichia coli* O157:H7 fluorocult, apesar de MUG positivas as colônias, apresentaram-se esverdeadas. O comportamento bioquímico e sorológico apresentado foram os mesmos do primo isolamento, não ocorrendo modificação fenotípica do microrganismo pela ação das substâncias químicas, adicionadas no preparo dos embutidos, como também pela ação na estocagem do produto. Nesta mesma metodologia, utilizando-se o enriquecimento para isolar EPEC, a recuperação, o comportamento e os resultados encontrados foram os mesmos da sementeira direta. Tanto as amostras de embutidos inoculados com os cultivos de *Escherichia coli*, quanto às mantidas como controle negativo, apresentaram cor e odor "sui generis" no 1º, 2º e 4º dias de manutenção a 4°C, entretanto no 7º dia quer sejam as amostras inoculadas, quanto as isentas da microbiota de inoculação, apresentaram coloração esverdeada na superfície interna e odor característico de alteração incipiente, indicando que até o 4º dia as amostras de lingüiça frescal tipo toscana, quando mantidas nestas condições, apresentaram características visuais e olfativas (sensoriais) próprias para o consumo, corroborando com o que ocorre em nível de comercialização nas redes dos grandes supermercados, que estabelecem o prazo de vida comercial de quatro dias quando este alimento é mantido nas condições mencionadas.

Os resultados apresentados na viabilidade da microbiota patogênica, em lingüiça frescal tipo toscana, caracterizam que apesar dos embutidos utilizados como controle negativo, estivessem isentos de *Escherichia coli*, deveriam possuir outros microrganismos que possivelmente foram determinadores das alterações sob o ponto de vista visual e olfativo.

Apesar de nenhum pesquisador ter realizado experimento semelhante, a contaminação natural de carne suína e derivados está bem reportada por vários autores. Calderon e Furlanetto (1990) pesquisaram coliformes totais e fecais em carnes suínas, encontrando 60,0% das amostras positivas para coliformes totais com NMP superiores a  $10^3/g$  e 23,3% positivas para coliformes fecais e, em particular, *Escherichia coli*, apresentando valores acima do máximo permitido ( $3 \times 10^2/g$ ) pelos padrões adotados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Fuzihara e Franco (1993) encontraram 51,0% de amostras de carnes suínas contaminadas por coliformes fecais com NMP acima de  $10^3/g$  num total de 100 amostras analisadas. Martins et al. (1993) verificaram a presença de coliformes totais em 15,0% das amostras de lingüiça defumada analisadas, não sendo detectados coliformes fecais. Oliveira et al. (1996) relatam que em análise de lingüiça frescal de porco, 31,0% e 11,9% apresentaram NMP de coliformes totais e fecais, respectivamente, acima do preconizado pela legislação vigente, sugerindo

melhora nas condições higiênico-sanitárias no processamento tecnológico e comercialização. Franco e Chaves (1997) em análises bacteriológicas procedidas em lingüiça frescal suína reportaram que 75,0% das amostras analisadas apresentaram coliformes fecais e 65,0% *Escherichia coli*, encontrando-se fora dos limites estabelecidos pelos padrões de identidade e qualidades vigentes, representando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e riscos à saúde pública. Martins et al. (1997) na avaliação higiênico sanitária de lingüiças tipo frescal (mista, suína, frango) e lingüiça defumada advertiram que 53,0% de lingüiça mista, 37,0% de carne suína, 31,6% de carne de frango estavam em desacordo com a legislação vigente, entretanto, as lingüiças defumadas se encontravam nos padrões microbiológicos exigidos pelo Ministério da Saúde. Pinto et al. (1999) avaliaram microbiologicamente produtos embutidos, sendo que 18,3% das amostras de lingüiças possuíam números superiores a  $5 \times 10^2$  coliformes por grama do produto. Sabioni et al. (1999) ao analisarem lingüiça frescal concluíram que 23,3% das amostras analisadas eram inaceitáveis para o consumo direto por apresentarem Número Mais Provável de coliformes fecais de 10 e até 100 vezes acima dos limites estabelecidos.

### Conclusões

Todas as cepas patogênicas utilizadas nesta pesquisa apresentaram viabilidade em amostras de lingüiça frescal tipo toscana sendo delas re-isoladas experimentalmente, constatando a importância da manipulação higiênico-sanitária satisfatória durante a industrialização da carne de suíno para que não ocorram contaminações da carcaça com *E. coli* patogênicas, visto que esta bactéria tem condições de se desenvolver neste alimento com risco em potencial para a saúde dos consumidores.

As amostras de lingüiça frescal tipo toscana isentas de *Escherichia coli* (controle negativo), devem possuir outros microrganismos determinadores de alterações visuais e olfativa, pelo fato dos alimentos de origem animal possuírem microbiota variável qualitativa e quantitativamente, embora não tenham sido pesquisadas.

### Referências Bibliográficas

ANTAI, S.P. ; ANOZIE, S.O. Incidence of infantile diarrhoea due to enteropathogenic *Escherichia coli* in Port Harcourt metropolis. *Journal Applied Bacteriology*, v.62, p.227-229, 1987.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Disease Information. *Diarrheagenic Escherichia coli* [on line]. 2000. Disponível: <http://www.cdc.gov/mcidod/dbmd/diseaseinfo/diarrecolit.htm> [acesso em 02 de setembro de 2007].

EWING, W.H. Edward's; Ewing's *Identification of Enterobacteriaceae*. 4<sup>th</sup> ed., Elsevier Science Publishers, New York, p.93-134, 1986.

FRANCO, R.M.; CHAVES, G.M.C. Avaliação bacteriológica da lingüiça frescal suína comercializada no município do Rio de Janeiro – R.J. – Brasil. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19., Rio de Janeiro. *Anais...* R.J.: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p.280.

FUZHARA, T.O. ; FRANCO, B.D.G.M. Bactérias patogênicas indicadoras de higiene em carne suína comercializada em Santo André, São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.13, n.1, p. 77-88, 1993.

KRIEG, N.R. ; HOLT, J.G. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams ; Wilkins, 8<sup>th</sup>, Baltimore M.D. 1984. 964p. v.1.

MARTINS, A.M.B.; RIBEIRO, E.G.A.; OLIVEIRA, M.A. de ; OLIVEIRA, S.A.V. de; ERRERA, M.C.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GELLI, D.S. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de lingüiças consumidas em Ribeirão Preto/S.P. e Região. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19., Rio de Janeiro. *Anais...* R.J.: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p.268.

MEHLMAN, I.J.; LOVETT, J. Enteropatogenic *Escherichia coli*. In: *Bacteriological Analytical Manual* 4<sup>th</sup> ed. Food and Drug Administration. Virginia. US. 1984c. p. 6-01.

MERCK. *Microbiology Manual Cultura Media*. Dormstadt, Germany, 405p., 1996.

OLIVEIRA, K.M.P.; BIDÓIA, A.D; NAKANO, M.H.; VENTURINI, S.; OLIVEIRA, T.C.R.M. de. Avaliação bacteriológica de lingüiça fresca de porco, salame e mortadela comercializados na região de Maringá – PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15., Poços de Caldas. *Anais...* M.G: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1996, p.72.

PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*. v.55, p.555-565, 1992.

PINTO, J.P.A.N.; CASTRO, A.P.; OHASHI, F.H.; AMARAL, G.P. Avaliação microbiológica de produtos embutidos encaminhados ao Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n.61, p.69-70, 1999.

SABIONI, J.G.; MAIA, A.R.P.; LEAL, J.A. Avaliação microbiológica de lingüiça frescal comercializada na cidade de Ouro Preto, M.G. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n.61, p.110-113, 1999.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM modificação do meio Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H<sub>2</sub>S, urease e triptofano desaminase. *Revista de Microbiologia*, v.13, p.309-315, 1982a.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. MILI um meio para a realização dos testes de mobilidade, indol e lisina descarboxilase. *Revista de Microbiologia*, v.13, p.230-235, 1982b.