

PESQUISA MOLECULAR E CONVENCIONAL DE *Listeria monocytogenes* PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DA CARNE SUÍNA

Loreane de Ana Guimarães dos Santos¹
Paulo Sérgio de Arruda Pinto¹
Mauro Pires Moraes¹
Maria Cristina Dantas Vanetti²
Paula Dias Bevilacqua¹
Mayara Souza Pinto¹
Francesca Silva Dias¹

RESUMO

Visando o controle de qualidade da carne suína, sobretudo no sistema APPCC, avaliou-se a contaminação superficial de carcaças e de tonsilas suínas com *Listeria monocytogenes* em estabelecimentos de abate. Foram coletadas 30 amostras de carcaças obtidas num matadouro-frigorífico de suínos fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, e 30 carcaças e 30 tonsilas em três estabelecimentos não inspecionados, localizados na mesma região geográfica. As amostras foram submetidas à análise microbiológica convencional e à técnica da PCR. Não houve diferença significativa entre os isolamentos de *L. monocytogenes* ($p = 0,47$) nas amostras de carcaças e tonsilas, quando se realizou a análise pelo método convencional, nem pelo ensaio da PCR ($p = 0,196$). A técnica da PCR mostrou-se mais sensível, rápida e viável economicamente para detectar *L. monocytogenes*, em comparação à convencional. A pesquisa de *L. monocytogenes* em estabelecimentos durante o processo de abate permite a detecção do referido microrganismo como um perigo a ser monitorado e controlado na carne suína pelo sistema APPCC.

Palavras chave: *Listeria monocytogenes*, abate de suínos, PCR, APPCC

ABSTRACT

MOLECULAR AND CONVENTIONAL DETERMINATION OF *Listeria monocytogenes* FOR PORK QUALITY CONTROL

The presence of *Listeria monocytogenes* was evaluated in swine carcasses and tonsils. Thirty carcass samples were obtained in a swine slaughterhouse under federal inspection, and 30 carcasses and 30 tonsils were also collected in three non inspected establishments located in the same geographical area. The samples were analyzed by conventional microbiological methods and by PCR. Differences were not significant for the isolation of *L. monocytogenes* ($p = 0,47$) from samples of carcasses and tonsils by the conventional method or by PCR ($p = 0,196$). PCR was more sensitive, rapid and economic to detect *L. monocytogenes* compared to the conventional technique. The detection of *L. monocytogenes* in establishments during the slaughter process allows the characterization of this microorganism as a hazard to be monitored and controlled in pork under the context of the APPCC.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, swine slaughter, PCR, APPCC.

¹ Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. E-mail pintosa@ufv.br

² Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG

INTRODUÇÃO

A bactéria *Listeria monocytogenes* causa a doença chamada listeriose em humanos, geralmente a partir do consumo de alimentos contaminados, gerando sérios comprometimentos da saúde de gestantes e recém-nascidos. Um grande número de casos de listeriose vem ocorrendo nos últimos anos, em função da mudança no estilo de vida dos consumidores, que utilizam cada vez mais a cadeia do frio no processo de produção de alimentos prontos para o consumo, aumentando a sua exposição ao agente (Hofer & Reis, 2005).

A existência de grupos de risco associada ao fato de o microrganismo ser passível de isolamento em alimentos processados, do tipo “pronto para consumo”, e, ou refrigerados tem despertado o interesse de indústrias alimentícias, autoridades de Saúde Pública e de pesquisadores em vários países (Loguercio *et al.*, 2001).

Dentre os patógenos freqüentemente isolados de carcaças suínas, encontra-se *L. monocytogenes* (Mc Mullen, 2000). Korsak *et al.* (1998), avaliando patógenos causadores de doenças de origem alimentar, detectaram a presença de *L. monocytogenes* na superfície de carcaças suínas e reafirmaram que o referido patógeno é um dos principais perigos para a saúde pública.

Nos últimos 10 anos, na França, os produtos de origem suína se mostraram mais freqüentemente envolvidos em surtos de listeriose do que os produtos derivados do leite, ressaltando a importância de mais pesquisas buscando a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos e na carne em natureza (Leclerc *et al.*, 2002).

Chasseignaux *et al.* (2002) investigaram a presença de *L. monocytogenes* em superfícies de trabalho em plantas de processamento de carne suína e a consideraram a principal fonte de contaminação da carne. Esse microrganismo também foi encontrado em equipamentos das áreas de recepção e processamento da carne.

Esta bactéria pode ser isolada de alimentos que tiveram contato com superfícies, pisos e paredes do matadouro. Nesse ambiente, os principais pontos de contaminação, durante o abate de suínos, estão associados às origens fecal, faringiana e ambiental (Borch *et al.*, 1996, Chasseignaux *et al.*, 2002).

Diante dos riscos conhecidos e visando a segurança alimentar, é sugerida a investigação da *L. monocytogenes* como um perigo microbiológico a ser controlado na carne suína, pelo sistema de “Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC”, sobretudo nas fases e em ambientes críticos do abate. Com esse propósito, devem ser utilizadas técnicas laboratoriais adequadas ao sistema APPCC, por serem as mais rápidas e de menor custo.

A pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos pode ser realizada utilizando-se métodos de cultivo tradicionais, seguidos de caracterização bioquímica, ou por meio de técnicas alternativas. Entre os métodos convencionais de análise microbiológica, encontram-se o método desenvolvido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), usualmente aplicado à análise de carne, produtos cárneos e esfregaços de superfícies, e o método da Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA), usualmente aplicado à análise de leite e produtos lácteos (Silva *et al.*, 1997).

Como técnicas alternativas para a detecção de *L. monocytogenes*, apresentam-se métodos que podem ser usados após o enriquecimento primário, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), ribotipagem, PCR 5' nuclease, nested PCR, amplificação ao acaso do DNA polimórfico (RAPD), eletroforese em gel 2 - D, dentre outros (Norton & Batt, 1999; Byuna *et al.*, 2001, Jaradat *et al.*, 2001; Chasseignaux *et al.*, 2002, Holko *et al.*; 2002).

Pretende-se, com esse trabalho, avaliar a contaminação superficial de carcaças e de tonsilas suínas com *L. monocytogenes* em estabelecimentos de abate, inspecionados ou não, como subsídio ao controle de qualidade da carne suína, sobretudo no sistema APPCC, comparando a técnica PCR com o método convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 30 amostras de carcaças obtidas num matadouro-frigorífico de suínos, fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), e 30 carcaças e 30 tonsilas em três estabelecimentos não inspecionados, localizados na mesma região geográfica, entre os meses

de março e novembro de 2003.

No estabelecimento com fiscalização do SIF, as amostras de carcaças foram analisadas pelo método convencional de isolamento e identificação de *Listeria* sp e *L. monocytogenes*. Nos estabelecimentos não fiscalizados, além do método convencional, utilizou-se a técnica da PCR em amostras de carcaças e tonsilas.

A determinação de *Listeria monocytogenes* foi feita por adaptação da técnica do USDA (*United States Department of Agriculture*) (Silva *et al.*, 1997), conforme descrito a seguir. No enriquecimento seletivo primário, 25 mL da amostra previamente homogeneizada foram cultivados em 225 mL de Caldo Universidade de Vermont (Oxoid CM 863) e incubados a 30°C durante 24 horas, como também foi feito paralelamente com o cultivo em Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB) (Oxoid CM 862). A seguir, no enriquecimento seletivo secundário, foi transferido 0,1 mL dos cultivos anteriores para tubos com 10 mL de Caldo Fraser (Oxoid CM 895), incubado a 35°C por 24 horas. Prosseguiu-se com o plaqueamento seletivo diferencial dos cultivos, que revelaram escurecimento no caldo Fraser em placas de Ágar Oxford Modificado (MOX) (Difco 0225, suplementado com colistina e moxalactam), incubando-se as placas a 35°C, durante 24 a 48 horas. Para a confirmação das colônias de *Listeria* sp, selecionaram-se pelo menos três colônias típicas de cada placa de Ágar Oxford Modificado, as quais foram estriadas em Ágar TSA-YE (Ágar Trypticase de Soja Difco 0369 suplementado com 0,6% de extrato de levedura) e incubadas a 30°C por 24 a 48 horas. As colônias foram observadas sob luz oblíqua, num ângulo de 45°. Foram selecionadas as colônias azuladas típicas, bem isoladas para a realização das provas de confirmação (identificação). Constituíram-se as provas de identificação: coloração de Gram, teste de catalase, teste de motilidade em ágar sulfeto indol motilidade a 20°C-25°C, teste de redução do nitrato, teste de verificação de hemólise, teste de fermentação da dextrose, xilose, rhamnose, manitol, maltose e esculina, e teste CAMP. Foram consideradas listerias típicas as culturas que mostraram o formato de “guarda-chuva” na prova da motilidade.

Para o ensaio da PCR, foi utilizado o cultivo oriundo dos homogenatos de esfregaços de carcaças em água peptonada e fragmentos de tonsila. As amostras de

DNA foram obtidas pelo método de extração fenol:clorofórmio, realizado segundo metodologia-padrão descrita por Sambrook *et al.* (1989).

Na amplificação do DNA, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *L. monocytogenes inlA*², sendo *InlA*(forward) 5'-CCTAGCAGGTCTAACCGCAC-3' e *InlA*(reverse) 5'-TCGCTAATTTGGTTATGCC-3' (7). A mistura de reação continha 15,5 µL de água³, 0,5 µL de 2 mM de mistura dNTP, 1U (0,2 µL) de Taq DNA polimerase², 2,5 µL de tampão PCR 10 X, 1,5 µL de 50 mM de tampão de cloreto de magnésio e 20 pmol (2,5 µL) do par de oligonucleotídeos. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação (94°C por 1 min.), anelamento (55°C por 2 minutos) e extensão do oligonucleotídeo (72°C por 1 min.). O DNA amplificado foi submetido, juntamente com marcador øX174 clivado com a enzima *HaeIII*³, à eletroforese com 1 a 2% de gel de agarose corado com 2 iL de brometo de etídio, a 10 mg/1 mL por 1 hora, e visualizado com luz UV. Como controle positivo, utilizou-se *L. monocytogenes* ATCC 7644, padrão obtido na Fundação Oswaldo Cruz.

Realizou-se a análise de custos das provas microbiológica convencional e PCR no que se refere à despesa com material de consumo, não sendo consideradas as despesas com mão-de-obra, vidrarias, equipamentos e encargos sociais, etc.

O teste Qui-quadrado foi utilizado a 5% de significância para análise das possíveis associações entre as seguintes variáveis: contaminação na carcaça e na tonsila com *L. monocytogenes*; desempenho dos testes microbiológico convencional e PCR e estabelecimento inspecionado e não-inspecionado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os resultados referentes aos esfregaços de superfície de carcaça e fragmentos de tonsilas nos estabelecimentos não-inspecionados, verificou-se que não houve diferença significativa entre eles para *L. monocytogenes* (p = 0,47), nem para *Listeria* sp. (p = 0,19), quando se realizou a análise partindo do método

² Imprint do Brasil, Belo Horizonte, MG, Brasil

³ Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA

convencional. Como este comportamento analítico confirmou-se no ensaio da PCR ($p = 0,196$), pode-se sugerir que ambas as amostras podem ser adequadas para a pesquisa de *L. monocytogenes* (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência (%) de *Listeria* sp e *Listeria monocytogenes* em carcaças e tonsilas suínas através do exame convencional e PCR nos estabelecimentos não-inspecionados

| | <i>Listeria</i> sp | | <i>Listeria monocytogenes</i> | |
|---------|--------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------|
| | Convencional | | Convencional | PCR |
| Carcaça | 4 | (13,3) ^a | 2 (6,66) ^a | 18 (60,0) ^b |
| Tonsila | 1 | (3,33) ^a | 0 (0,0) ^a | 13 (43,3) ^b |

Frequências de mesma coluna (*Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp) e linha (*Listeria monocytogenes*), seguidos de uma mesma letra, não apresentaram diferença estatisticamente significativa a 5% de significância.

Entre as vantagens e desvantagens das amostras escolhidas, ressalta-se que a coleta de tonsila dispensa a interrupção da linha de abate para a realização da pesquisa, o que não ocorre quando a coleta é realizada por esfregaços de superfície das carcaças. Assim, o estabelecimento em estudo não tem seu fluxo de abate alterado durante a execução desta atividade num procedimento de verificação de um plano APPCC. Por outro lado, os procedimentos de inspeção e de coleta das tonsilas também se constituem em risco de contaminação da carcaça a partir das mãos dos operários e das facas (Borch *et al.*, 1996). Desse modo, o esfregaço de superfície, como forma de obtenção de amostras, torna-se uma opção com menor risco de contaminação da carne. Além disso, quando se pretende, numa análise de risco, a determinação de pontos críticos de controle de um plano APPCC, somente a coleta de amostras da superfície permite o acompanhamento das diversas etapas do abate.

As reações da PCR de *L. monocytogenes* obtidas em uma amostra positiva de carcaça (banda de 255 pb), um controle negativo e um controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644), estão ilustradas na Figura 1.

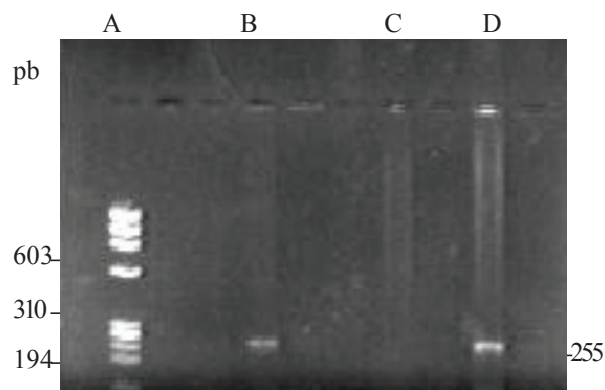


Figura 1 - Resultado da PCR de uma amostra positiva para *L. monocytogenes* ATCC 7644 (B), controle negativo (C) e controle positivo (D), segundo o marcador molecular ϕ X174/*Hae*III (A).

Uma frequência de *L. monocytogenes* estatisticamente maior que a obtida pela metodologia convencional foi observada no ensaio da PCR (Tabela 1), tanto a partir de esfregaços de superfície de carcaças ($p = 0,00001$) como a partir de fragmentos de tonsila ($p = 0,00005$). Este resultado deve ser interpretado com cuidado devido ao fato da técnica ser muito sensível e identificar a presença do DNA bacteriano, mesmo sem a viabilidade da bactéria. Neste caso, o patógeno não representaria risco para a saúde pública.

A detecção de *L. monocytogenes* pelos métodos convencionais pode subestimar sua presença caso se encontre injuriada, dificultando seu isolamento, o que implicaria resultados falsos-negativos (Williams & Golden, 2001). Sendo assim, o ensaio da PCR torna-se uma técnica importante para detectar o microrganismo e estabelecer um limite crítico de contaminação a ser verificado e controlado num plano APPCC.

A pesquisa microbiológica convencional de *L. monocytogenes* demanda tempo, geralmente atinge duas semanas, para a confirmação do microrganismo, enquanto que o ensaio da PCR pode ser realizado num prazo de 24 horas. Diante de um surto de toxinfecção alimentar em que há características da listeriose, a pesquisa convencional torna-se menos oportuna que a PCR. Ainda é possível monitorar, por essa técnica, um lote de carcaças antes da sua distribuição ao comércio, enquanto se encontra em processo de refrigeração no estabelecimento de abate.

Farber & Peterkin (1991) também enfatizaram algumas desvantagens dos métodos convencionais,

quando os consideraram laboriosos e passíveis de resultados variáveis.

Alguns autores, pesquisando *L. monocytogenes* em alimentos pela técnica da PCR, despenderam, no máximo, 36 horas para obtenção do resultado, enquanto que a pesquisa por técnicas convencionais chegou a 14 dias (Jaradat *et al.*, 2001, Holko *et al.*, 2002).

O custo da realização das análises considerando-se um laboratório montado, contando-se apenas o custo com reagentes e meios de cultura, encontra-se em torno de US\$ 7,38 por amostra na pesquisa convencional. Neste aspecto, o ensaio da PCR apresenta-se como uma boa alternativa na identificação do agente em questão, mostrando-se uma técnica mais econômica, quanto ao consumo de reagentes na pesquisa do referido agente, pois seu custo está em torno de US\$ 2,09 por amostra.

Quando se compararam o estabelecimento inspecionado e os não-inspecionados em relação à frequência das bactérias estudadas, não se observou diferença significativa, com *L. monocytogenes* ($p = 1,00$) e *Listeria* sp ($p = 0,66$). Embora não tenha ocorrido a diferença significativa, observou-se uma frequência maior no estabelecimento não-inspecionado (Tabela 2). O abate de animais em estabelecimento não-inspecionado geralmente está associado a condições precárias de instalações, higiene e procedimento operacional de abate, aumentando o risco de contaminação da carne suína por patógenos em geral.

Tabela 2. Frequência (%) de *Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp por estabelecimentos inspecionado e não-inspecionado pelo método convencional

| | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria</i> sp |
|------------------|-------------------------------|------------------------|
| Inspecionado | 1 (3,33) ^a | 2 (6,66) ^b |
| Não-inspecionado | 2 (6,66) ^a | 4 (13,33) ^b |

Frequências de mesma coluna seguidos de uma mesma letra não apresentaram diferença estatisticamente significativa a 5% de significância.

A determinação de *L. monocytogenes* na carne suína durante o seu abate, seja em matadouros-frigoríficos inspecionados, como apoio às ações de controle de qualidade, APPCC por exemplo, seja em situações de abate clandestino, pode ser facilitada com o emprego de técnicas mais apropriadas, como a PCR,

favorecendo o controle de patógenos como a *L. monocytogenes*.

CONCLUSÕES

A pesquisa de *L. monocytogenes* em estabelecimentos durante o processo de abate permite a detecção do referido microrganismo como um perigo a ser verificado e controlado na carne suína.

A técnica da PCR é mais sensível, rápida e viável economicamente para detectar *L. monocytogenes*, podendo ser empregada em atividades de monitoramento da *L. monocytogenes* num plano APPCC.

A bactéria *L. monocytogenes* no abate de suínos pode ser detectada pela técnica da PCR em amostras de tonsila como alternativa ao esfregaço de superfície da carcaça, evitando-se maiores interrupções no processo de abate, quando se deseja caracterizar a presença do microrganismo nesse ambiente. Por outro lado, a pesquisa de *L. monocytogenes* por coleta de esfregaços de carcaça também auxilia na determinação de pontos críticos de controle no sistema APPCC, quando as contaminações da carne, a partir de tonsilas, são frequentes nas coletas de amostras.

REFERÊNCIAS

- Borch E, Nesbakken T & Christensen H (1996) Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 30:9-25.
- Byuna SK, Junga SC & Yoob, HS (2001) Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. *International Journal of Food Microbiology* 69:227-235.
- Chasseignaux E, Gérault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P & Ermel, G (2002) Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters* 210:271-275.
- Farber JM & Peterkin PI (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55:476-511.
- Hofer E & Reis CMF (2005) Espécies e sorovares de *Listeria* isolados de animais doentes e portadores no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2:79-83.

- Holko I, Urbanová J, Kantiková M, Pástorová K & Kmet V (2002) PCR detection in milk and milk products and differentiation of suspect isolates. *Acta Veterinaria Brno* 71:125-131.
- Jaradat ZW, Schutze GE & Bhunia AK (2001) Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meta products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *International Journal of Food Microbiology* 76:1-10.
- Korsak N, Daube G, Ghafir Y, Chahed A, Jolly S & Vindevogel H (1998) An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine belgian abattoirs. *Journal of Food Protection* 61:535-541.
- Leclerc V, Dufour B, Lombard B, Gauchard F, Garin-Bastuji B, Slavat G, Brisabois A, Poumeyrol M, De Buyser ML, Gnaunou-Besse N & Lahellee C (2002) Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. *Livestock Production Science* 76:195-202.
- Loguercio AP, Silva WP, Aleixo JAG, Costa MM & Vargas AC (2001) *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. *Higiene Alimentar* 15:39-48.
- Mc Mullen LM (2000) Intervention strategies to improve the safety of pork. *Advances of Pork Production* 11:165-173.
- Norton DM & Batt CA (1999) Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2122-2127.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2 nd.ed. Cold Spring Harbor Laboratory, USA. 396p.
- Silva N, Junqueira VCA & Silveira NFA (1997). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo, Varela. 295p.
- Williams RC & Golden DA (2001) Influence of modified atmospheric storage, lactic acid, and NaCl on survival of sublethally heat-injured *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 64:379-386.

Aceito para publicação em 11/09/2006