

OCORRÊNCIA DE *Listeria spp.* E DE *Listeria monocytogenes*, EM UM MATADOURO-FRIGORÍFICO DE BOVINOS DO ESTADO DE SÃO PAULO

OCCURRENCE OF *Listeria spp.* AND *Listeria monocytogenes*, AT A SLAUGHTERHOUSE BOVINE OF THE STATE OF SÃO PAULO

Kelly CASELANI¹; Luiz Francisco PRATA¹; Paula Adriana BIZARI¹;
Gener Tadeu PEREIRA²; Patrícia Gelli Feres de MARCHI¹;
Mirelle Andréa de Carvalho PICINATO¹

1. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. kellycaselani@yahoo.com.br. 2. Departamento de Ciências Exatas - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

RESUMO: A ocorrência de *Listeria spp.* e de *Listeria monocytogenes*, foi avaliada em amostras ambientais por meio de suabes colhidos em matadouro-frigorífico de bovinos habilitado à exportação, localizado no Estado de São Paulo, Brasil. Após o pré-enriquecimento a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 22 à 26h as amostras foram analisadas empregando o BAX® System *Listeria*. As amostras positivas para *Listeria spp.* foram submetidas à uma nova reação de PCR para a confirmação da presença de *Listeria monocytogenes*. Das 411 amostras ambientais analisadas, 62 (15,1%) foram positivas para *Listeria spp.* e 21 (5,1%) para *Listeria monocytogenes* (5,1%), o que mostrou sua persistência na planta de abate. Não foi detectada diferença estatística entre os períodos seco e chuvoso e entre as superfícies amostradas, porém diferença estatística foi encontrada entre setores. A superfície do piso e o setor de cortes apresentaram os maiores índices de positividade.

PALAVRAS-CHAVE: *Listeria spp.*. Bovino. Abate. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Listeria* são amplamente difundidas no meio ambiente e podem ser encontradas, não somente em alimentos, mas em outras fontes como solo, material fecal, efluente de esgoto, vegetação e corpos de água (VÁZQUEZ-SALINAS et al., 2001; QUINN et al., 2005). Em bovinos de corte, as fontes de infecção de origem alimentar não são bem estabelecidas. Estudos atribuíram esta infecção ao sistema de manejo, incluindo as práticas nutricionais (MOHAMED et al., 2010). Embora a silagem tenha sido identificada como uma importante fonte de *L. monocytogenes* entre animais de fazenda, especialmente ruminantes, a pastagem também pode ser uma fonte de infecção, sobretudo aquela de vegetação natural (VARNAM, 1991).

Listeria monocytogenes pode causar septicemia, meningite, encefalite, infecção cervical ou intra-uterina em gestantes, além de abortos e nascimentos de prematuros (CVE, 2003). Essa bactéria patogênica tem sido isolada em uma extensa variedade de alimentos tais como leite cru, queijos, sorvetes, vegetais crus, salsichas de carne crua fermentada, carne de aves cruas ou cozidas, carnes cruas (de qualquer tipo) e peixe cru ou defumado (FDA, 2009). Surtos de origem alimentar devido ao consumo de carne e produtos cárneos contaminados com *L. monocytogenes* foram notificados em vários países (CDC, 1998; CDC,

2000; CDC, 2002; GOTTLIEB et al., 2006), entretanto no Brasil a listeriose é subdiagnosticada e subnotificada (CVE, 2003).

Por ser um microrganismo onipresente, as indústrias processadoras de alimentos são facilmente contaminadas por alimentos crus (AFSSA, 2000). *L. monocytogenes* pode subsistir nestes locais pela sua capacidade de permanecer viável após repetidos congelamentos e descongelamentos, aderindo às diversas superfícies de contato de alimentos pela formação de biofilmes (SALVAT et al., 1995; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Uma vez instalada no local, ela é capaz de aderir a vários tipos de superfície, que incluem o aço inoxidável, vidro e borracha (MARZOCCA et al., 2004). Algumas cepas de *L. monocytogenes* são persistentes, capazes de permanecer meses, ou até anos, no ambiente de processamento, podendo assim provocar contaminações recorrentes no produto final (MARKKULA et al., 2005). Contudo, tais biofilmes podem agir como um reservatório para a contaminação de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos (MØRETRØ; LANGSRUD, 2004). Além disso, ela sobrevive nos dedos dos operários após a lavagem das mãos e nos aerossóis, fechando a cadeia de transmissão dentro das plantas processadoras (MARZOCCA et al., 2004).

A fim de prevenir e controlar a contaminação ambiental e de produtos com este patógeno, é importante detectar as fontes de contaminação mais relevantes e compreender os

mecanismos para a persistência de diferentes grupos de *L. monocytogenes* no ambiente (GUDBJORNSDÓTTIR et al., 2004). A falta de informação quanto a sua ocorrência em matadouros-frigoríficos no Brasil pode dificultar o seu controle e, conseqüentemente, a redução do risco de listeriose humana. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivos: determinar a frequência de ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de diferentes ambientes de um matadouro-frigorífico de bovinos, com ênfase em *L. monocytogenes*; e estabelecer possíveis fontes de contaminação dentro da planta de abate.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa foram colhidas amostras de ralos, pisos, evaporadores, esteiras, mesas, dutos e serras, de um matadouro-frigorífico de bovinos habilitado à exportação, localizado no município de Barretos-SP entre novembro de 2008 e outubro de 2009. As 411 amostras foram obtidas por meio de esponjas de celulose estéreis umedecidas e esfregadas 10 vezes no sentido ascendente e por toda a superfície a ser amostrada, priorizando principalmente locais de difícil acesso. As esponjas foram acondicionadas em bolsas plásticas estéreis (Nasco), contendo 10mL de caldo BAX® System *Listeria* (DUPONT QUALICON, 2005). Para essa monitoração foi estabelecida uma rotina semanal, com no mínimo seis (6) pontos de colheita, os quais foram sorteados imediatamente antes para a definição do local e objetos (equipamento ou instalação) a serem amostrados.

Nas bolsas plásticas contendo as esponjas estéreis foram adicionados 25mL do caldo BAX® System *Listeria*, completando 35mL. As bolsas foram homogeneizadas em “stomacher” por um minuto a 200rpm e incubadas em estufa a 30±1°C por 22 à 26h. Após o período de pré-enriquecimento, as amostras foram submetidas à análise pela reação de PCR, no BAX® System com o kit BAX® System *Genus Listeria*. Foi retirada uma alíquota de 5µL de cada amostra, sendo adicionada em microtubos contendo 200µL de lise-protease. Primeiramente, os microtubos foram levados para o 1º bloco aquecedor a 55°C por 60min. Após o término do tempo, os mesmos foram transferidos para o 2º bloco aquecedor a 95°C por 10 min. Em seguida, os microtubos foram colocados em bloco de resfriamento por cerca de 5 min. Alíquotas de 50µL foram transferidas para tubos contendo pastilhas de PCR, as quais são compostas por iniciadores ou primers, polimerase, nucleotídeos

e controle positivo; sendo posteriormente alojados em uma “rack” que foi levada ao termociclador (DUPONT QUALICON, 2005).

As amostras positivas para *Listeria* spp. no BAX® System *Listeria* foram investigadas quanto à presença de *L. monocytogenes* com o auxílio do kit BAX® System *Listeria monocytogenes*. Alíquotas de 0,1mL do pré-enriquecimento primário foram transferidas para tubos de ensaio de tampa rosqueável de 10mL, sendo acrescentado a eles 9,9mL do pré-enriquecimento secundário chamado MOPS-BLEB. Os tubos de ensaio foram homogeneizados em “vortex” a 2800rpm e incubados a 36±1°C por 18 às 24h. Após este procedimento seguiu-se normalmente a sequência da análise, citada anteriormente. Juntamente com as amostras e sempre que ocorria a mudança de lote dos kits, foram realizados controles positivos com cepas *American Type Culture Collection*, adquiridas do Instituto Adolfo Lutz (ATCC 7644-IAL).

Na análise estatística, o teste qui-quadrado foi utilizado para testar a dependência entre meses e períodos do ano (seco e chuvoso), estabelecidos pelas médias mensais dos índices pluviométricos, setores do matadouro-frigorífico e superfícies ambientais e a presença ou ausência de *Listeria* sp e *Listeria monocytogenes*. Todos os resultados estatísticos deste trabalho foram analisados no programa SAS 9.1, em que um valor de p<0,05 foi considerado significativo (DEER; EVERITT, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 411 amostras ambientais analisadas, 62 (15,1%), foram positivas para *Listeria* spp.. Dessas, 21 (5,1%) amostras foram positivas para *Listeria monocytogenes*. Com exceção dos meses de abril, julho, agosto e setembro de 2009, em todos os demais meses do período houve a detecção de *Listeria monocytogenes* em uma ou mais amostras, o que indicou relativa persistência no ambiente de abate (Figura 1).

Apesar da Circular nº 354/2004 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) (BRASIL, 2004) não estabelecer limites para as estimativas de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, de acordo com a legislação, resultados positivos frequentes (mais de dois) em amostras ambientais para *Listeria* spp., indicam a necessidade de realização de testes no produto final para avaliar a inocuidade do mesmo. Sendo assim, resultados positivos frequentes, como os encontrados no presente trabalho, são importantes para avaliar os programas sentinelas, buscando a

ausência de contaminação do produto final, por este

patógeno.

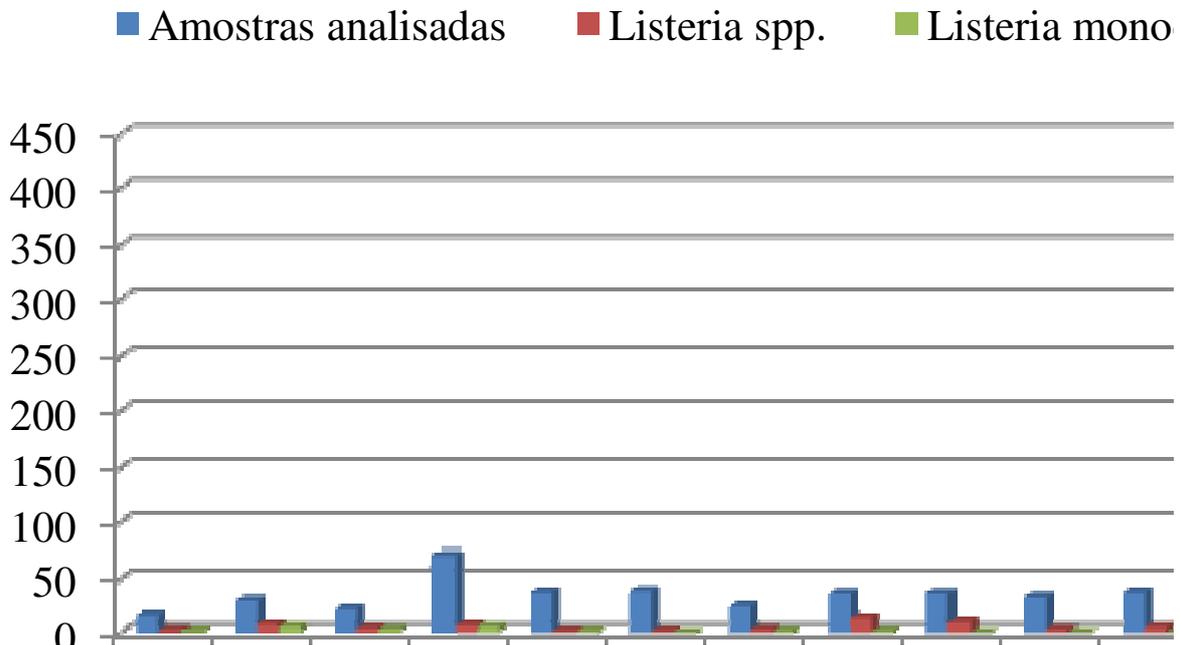


Figura 1. Positividade de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes*, em diferentes setores do estabelecimento de abate de bovinos de novembro de 2008 a outubro de 2009. Barretos-SP, 2010.

A presença de *Listeria* spp. diferiu estatisticamente entre os meses do ano ($p=0,0002$), no entanto, quando testou-se a independência de sua ocorrência entre os períodos seco e chuvoso, o mesmo não foi significativo ($p=0,2051$). Das 176 amostras analisadas no período chuvoso, 22 (12,5%) foram positivas para *Listeria* spp., valor este muito próximo dos encontrados no período seco, com 40 (17%) amostras positivas, em 235 pesquisadas. Gudbjörnsdóttir et al. (2004) relataram resultado semelhante, ao analisarem 1.689 amostras de ambientes coletadas em plantas processadoras de carnes, frutos do mar e aves, e observarem a falta de sazonalidade na frequência de *L. monocytogenes*.

Valor muito próximo ao presente estudo foi descrito por Samelis e Metaxopoulos (1999) na Grécia ao isolarem *Listeria* spp. em 14,3% dos equipamentos amostrados. Contudo, em 68,8% dessas amostras foi observada a presença de *L. monocytogenes*, indicando baixa eficiência nos procedimentos de desinfecção. Resultado inferior foi relatado por Gudbjörnsdóttir et al. (2004) em amostras ambientais na Europa, sendo a taxa de ocorrência de 11,9% para *L. monocytogenes*, onde a maioria (65,8%) era proveniente de equipamentos, correias transportadoras, bandejas e outros transportadores. Após a higienização, 11,5% das amostras ainda estavam contaminadas com *Listeria*

spp. e 8,3% com *L. monocytogenes*, indicando insuficiência nos processos de limpeza.

Todavia, em estabelecimentos processadores de carne no Brasil, Barros et al. (2007) encontraram valores acima dos anteriormente relatados. Em 51,4% e 35,4% das amostras de superfícies de equipamentos e de ambientes, respectivamente, foi detectada a presença de *Listeria* spp.

Em relação à pesquisa de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* nos diferentes setores do estabelecimento de abate, com exceção dos meses de novembro, fevereiro e outubro, todos os demais meses do experimento prevaleceu a coleta de amostras no setor da desossa. O maior volume de amostras (71) foi registrado no mês de fevereiro, destacando o setor de conserva com 26 amostras para o mesmo período com diferença estatística entre os diferentes setores, quanto à presença de *Listeria* spp. ($p=0,02$).

Verificou-se que somente nos meses de junho e agosto, quando predomina tempo mais seco e frio, houve detecção de *Listeria* spp. no setor de abate. Das 56 amostras analisadas, 2 (3,6%) apresentaram-se positivas. No setor das câmaras, a presença de *Listeria* spp. foi observada nos meses de dezembro e fevereiro, de maio a julho e no mês de outubro. No total, foram colhidas 64 amostras, sendo nove (14,1%) positivas. O mês de junho

apresentou o maior índice de positividade, com três amostras.

Com exceção do mês de abril, em todos os demais meses foi detectada a presença de *Listeria* spp. em pelo menos uma amostra no setor de desossa. Constatou-se 18,4% (21) de amostras positivas, em um total de 114 amostras, sendo o segundo setor mais problemático dentro do matadouro-frigorífico estudado. Para o setor de conserva, foram colhidas 55 amostras. Dessas, oito (14,5%) amostras foram positivas para *Listeria* spp., com ausência de coleta nos meses de maio e outubro e positividade entre os meses de dezembro e fevereiro, abril, julho e setembro.

O setor de cortes apresentou-se como o mais preocupante no matadouro-frigorífico em estudo, provavelmente por apresentar condições favoráveis à formação de biofilmes sobre as superfícies. Com 10 (18,9%) amostras positivas para *Listeria* spp., dentre as 53 analisadas, as mesmas ficaram concentradas entre os meses de novembro e janeiro e entre maio e julho. Marzocca et al. (2004)

isolaram *L. monocytogenes* em valor inferior a este (6,7%) na sala de cortes, em um frigorífico na Argentina.

Na Tabela 1 encontram-se os resultados das análises de amostras ambientais para a presença de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*, nas diferentes superfícies do frigorífico. Não existem evidências suficientes para rejeitar a hipótese de independência entre a presença/ausência de *Listeria* spp. em relação às superfícies ($p=0,1266$), entretanto o piso foi o local que mostrou ser o mais problemático, com 30 (18,5%) amostras positivas para *Listeria* spp., sendo 8 amostras para *L. monocytogenes*, e em segundo lugar, o ralo, com 22 amostras positivas para *Listeria* spp e mesmo valor para *L. monocytogenes* (8 amostras positivas). Não há dados na literatura que justifiquem o isolamento nestas superfícies, no entanto, a capacidade desse microrganismo em sobreviver a temperaturas baixas e formar biofilmes, aliados a limpeza e sanitização ineficientes, permitem seu alojamento em vários locais da planta de abate, como pisos e ralos.

Tabela 1. Resultados das análises de amostras ambientais para a presença de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*, nas diferentes superfícies do estabelecimento de abate de novembro de 2008 a outubro de 2009. Barretos-SP, 2010.

Superfície	Negativa	%	<i>Listeria</i> spp.	%	<i>Listeria monocytogenes</i>	%	Total
Evaporador	69	93,2	5	6,8	2	2,7	74
Piso	132	81,5	30	18,5	8	4,9	162
Ralo	115	83,9	22	16,1	8	5,8	137
Outros	33	86,8	5	13,2	3	7,9	38
Total	349	84,9	62	15,1	21	5,1	411

PECCIO et al. (2003), ao analisarem amostras de superfícies de ambiente e equipamentos, detectaram *L. monocytogenes* em 6,5% das amostras, todas elas de faca, com uma amostra positiva após a higienização, o que mostrou sua persistência no ambiente de abate. Neste trabalho, não foram amostradas superfícies de faca, entretanto o isolamento de *L. monocytogenes* em 5,1% das amostras analisadas sugere sua permanência na rotina do matadouro-frigorífico estudado, uma vez que todas as amostras foram colhidas após o processo de higienização.

CONCLUSÕES

Um número elevado de amostras ambientais foi positiva para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, sendo o setor de cortes e a superfície do piso os de maior ocorrência.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os períodos do ano e superfícies amostradas, demonstrando relativa persistência desses microrganismos no ambiente de abate e consequente risco de contaminação do produto final.

ABSTRACT: We evaluated the presence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in environmental samples by means of swabs collected the bovine slaughter plant enabled to export, located in the state of Sao Paulo, Brazil. After the pre-enrichment at $30\pm 1^\circ\text{C}$ for 22 to 26h the samples were analyzed using the BAX System *Listeria*. Those positive for *Listeria* spp. were submitted a second PCR reaction to confirm the presence of *Listeria monocytogenes*. From 411 environmental samples analyzed, 62 (15.1%) were positive for *Listeria* spp. and 21 (5.1%) for *Listeria monocytogenes*, which showed their persistence in the slaughter plant. There were no statistical differences between the rainy and dry

periods and between areas sampled, although it has been found between sectors. The floor surface and the sector cuts have higher rates of positivity.

KEYWORDS: *Listeria* spp. Bovine. Slaughter. Polymerase Chain Reaction (PCR).

REFERÊNCIAS

- AFSSA. Agence Française de Securite Sanitaire des Aliments. **Rapport de La commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes***. Section C: écologie de *L. monocytogenes*. Maisons-Alfort. 2000. 144 p.
- BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; MANOEL, A. V. B.; DOVÍDIO, L.; SILVA, L. C.; FRANCO, B. D. G. M.; BELOTI, V. *Listeria* spp. associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 603-609, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular no 354/2004/DCI/DIPOA. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil**, Brasília – DF, 25 jun. 2004. p. 3, 8.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis-United States, 1998. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 47, n. 50, p. 1085-1086, 1998.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis-United States, 2000. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. 50, p. 1129-1130, 2000.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Public health dispatch: outbreak of listeriosis-Northeastern United States, 2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 51, n. 42, p. 950-951, 2002.
- CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Informe-Net DTA-Doenças transmitidas por alimentos e água: *Listeria monocytogenes*/Listeriose**. 2003. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Listeria.htm>>. Acesso em: 16 jan. 2011.
- DEER, G.; EVERITT, B. S. **A handbook of statistical anlyses**. 2 ed. Chapman & Hall/CRC: Boca Raton. 2002. 360 p.
- DUPONT QUALICON. **Sistema BAX[®]. Análise em PCR com detecção automatizada**: Manual do usuário. 2005. 107p.
- FDA. Food and Drug Administration. Bad Bug Book: *Listeria monocytogenes*. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllne>>
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: _____. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 4, p. 33-82.
- GOTTLIEB, S. L.; NEWBERN, E. C.; GRIFFIN, P. M.; GRAVES, L. M.; HOEKSTRA, R. M.; BAKER, N. L.; HUNTER, S. B.; HOLT, K. G.; RAMSEY, F.; HEAD, M.; LEVINE, P.; JOHNSON, G.; SCHOONMAKER-BOPP, D.; REDDY, V.; KORNSTEIN, L.; GERWEL, M.; NSUBUGA, J.; EDWARDS, L.; STONECIPHER, S.; HURD, S.; AUSTIN, D.; JEFFERSON, M. A.; YOUNG, S. D.; HISE, K.; CHERNAK, E. D.; SOBEL, J. Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, n. 1, p. 29-36, 2006.

- GUDBJORNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M. L.; GUSTAVSSON, P.; THORKELSSON, G.; SALO, S.; SJOBERG, A. M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, Londres, v. 21, n. 2, p. 217-225, 2004.
- MARKKULA, A.; AUTIO, T.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 6, p. 1228-1231, 2005.
- MARZOCCA, M. A.; MARUCCI, P. L.; SICA, M. G.; ALVAREZ, E. E. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 36, p. 179-81, 2004.
- MOHAMMED, H. O.; ATWILL, E.; DUNBAR, L.; WARD, T.; MCDONOUGH, P.; GONZALEZ, R.; STIPETIC, K. The risk of *Listeria monocytogenes* infection in beef cattle operations. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 1, p. 349-356, 2010.
- MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 107-121, 2004.
- PECCIO, A.; AUTIO, T.; KORKEALA, H.; ROSMINI, R.; TREVISANI, M. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 234-238, 2003.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Família *Enterobacteriaceae*. In: _____. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 18, p. 115-130.
- SALVAT, G.; TOQUIN, M. T.; MICHEL, Y.; COLIN, P. Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 75-81, 1995.
- SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. **Food Microbiology**, Londres, v. 16, p. 465-477, 1999.
- VARNAM, A. H. **Foodborne pathogens**. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. 557 p.
- VÁZQUEZ-SALINAS, C.; RODAS-SUÁREZ, O.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E. I. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico City. **Food Microbiology**, Londres, v. 18, n. 2, p. 177-181, 2001.