

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**OCORRÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM
FRANGOS ALTERNATIVOS**

CLEISE DE OLIVEIRA SIGARINI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia, área de concentração em nutrição e
produção animal, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU – SP
Novembro - 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**OCORRÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM
FRANGOS ALTERNATIVOS**

CLEISE DE OLIVEIRA SIGARINI
Médica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça
Co-Orientador: Prof. Dr. José Paes de A. Nogueira Pinto

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia, área de concentração em nutrição e
produção animal, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU – SP
Novembro - 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Sigarini, Cleise de Oliveira, 1977-
S574o Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em frangos alternativos / Cleise de Oliveira Sigarini. - Botucatu : [s.n.], 2009.
x, 62 f. : il. color., fots., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009
Orientador: Roberto de Oliveira Roça
Co-orientador: José Paes de A. Nogueira Pinto
Inclui bibliografia.

1. Aves - Abate. 2. Alimentos - Microbiologia. 3. Criação alternativa. 4. *Listeria monocytogenes*. 5. Frangos de corte. I. Roça, Roberto de Oliveira. II. Pinto, José Paes de A. Nogueira. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

*"Somos o que fazemos repetidamente. Por isso o mérito não está
na ação e sim no hábito".*

Aristóteles

Dedico...

Ao meu porto seguro Alysson Sander de Souza!!

Agradecimentos

Especialmente a Deus, por tornar tudo possível.

Ao meu Orientador Prof. Dr. **Roberto de Oliveira Roça**, por seu carinho de pai, pelas palavras amigas nos dias de desânimo e pela flexibilidade durante a orientação. Quero que saiba que o admiro muito por sua postura profissional e por compartilhar o seu conhecimento sedimentado ao longo dos anos e todas as atualizações em pesquisa adquiridos após horas de leitura e estudo. Obrigado por me ajudar a chegar até aqui.

Ao meu co orientador Prof. Dr. **José Paes de Almeida Nogueira Pinto**, pela boa vontade e auxílio em todas as etapas desenvolvimento desta tese.

Ao **Frigorífico Korin** (Ipeúna – SP) por permitir a colheita de amostra em suas dependências.

A Médica Veterinária **Leikka Iwamura**, do Serviço de Inspeção Federal, pelas facilidades oferecidas durante a execução do experimento.

A minha mãe, **Arlete B. de Oliveira**, por me fazer entender desde muito cedo que este caminho mudaria minha vida.

A meu esposo, **Alysson Sander de Souza**, por seu incentivo, carinho, tolerância e acima de tudo pela cumplicidade. Agradeço por embarcar em mais uma das minhas jornadas.

Aos amigos **João Garcia Caramori Júnior, Loredano Ovídio, Júlia Galvão, Givago F. da Silva e Eduardo Figueiredo**, por toda ajuda e incentivo.

Aos professores da UFMT de Microbiologia Geral e de Biologia Molecular, **Valéria Dutra** e **Luciano Nakazato**, por toda consideração, generosidade e envolvimento de vocês durante todas as etapas de desenvolvimento da parte molecular desta tese. Muito obrigado por todas as suas orientações, conselhos e ajustes, especialmente durante a etapa de padronização. A consideração de vocês me emociona.

Aos pesquisadores **Ricardo Ichiro Sakate, Maria Teresa Destro, Eb Chiarini, Ernesto Hofer e Enrico Buenaventura**, por toda contribuição de vocês. Obrigado pela paciência e disposição em auxiliar o desenvolvimento desta pesquisa.

A **Seila Cristina Vieira e Danilo Juarez Dias**, seção de Pós-graduação da FMVZ-UNESP – Botucatu. Agradeço pela paciência e presteza dispensadas nestes três anos de convivência. Obrigado pela consideração de vocês, porque são os pequenos gestos que fazem a diferença.

Aos amigos **Ernani Neri de Andrade, Aurélia P. Araújo, Quézia Pereira, Dorival Pereira Borges da Costa, Natália Bortoleto, Marcos Benedetti, Fabyola Carvalho, Ana Stradioti, Érica Sernagiotto, Juliana Bendini, Juliana Paes, Mário Eduardo B. Baldini, Renato Neves, André Matos e Myrna Campos** a convivência com vocês nesses últimos anos fez da minha estada em Botucatu inesquecível. Agradeço a cada um de vocês por todas as vezes que pedi ajuda e fui prontamente atendida.

A **CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pela bolsa de estudo concedida durante o Doutorado.

A **FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pelo auxílio a pesquisa - Processo 2007/07053-1.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
Panorama da avicultura de corte	1
O surgimento dos sistemas alternativos	3
Qualidade bacteriológica da carne de frango	7
<i>Listeria monocytogenes</i> : importância em saúde pública	8
Mecanismos de patogenicidade	11
Referências Bibliográficas	15
CAPÍTULO 2: OCORRÊNCIA DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EM FRANGOS ALTERNATIVOS	19
RESUMO	20
SUMMARY	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	24
Considerações iniciais	24
Material	26
Carcaças e cortes	26
Amostras de água	27
Luvas dos manipuladores	27
Superfície em contato com o alimento	27
Métodos	28
Metodologia tradicional	28
Enriquecimento seletivo primário	29
Enriquecimento seletivo secundário	29
Plaqueamento seletivo diferencial	29
Purificação	30
Identificação bioquímica	30
Metodologia molecular	31

Extração do DNA bacteriano	31
Preparo da reação e amplificação	32
Eletroforese	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

CAPÍTULO 3: CEPAS NÃO HEMOLÍTICAS DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ISOLADAS EM AMBIENTE DE ABATE DE FRANGO ALTERNATIVO	46
RESUMO	47
SUMMARY	48
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS	51
Considerações iniciais	51
Material	52
Métodos	53
Extração do DNA bacteriano	53
Preparo da reação e amplificação	54
Eletroforese	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

CAPÍTULO 4: IMPLICAÇÕES	62
--------------------------------	----

Lista de Figuras

Capítulo 1

	Página
Figura 1 Principais correntes de pensamento ligados ao movimento e seus precursores (DAROLT, 2001).	5
Figura 2 Esquema de ciclo intracelular de <i>L. monocytogenes</i> (fonte: VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).	12
Figura 3 Mecanismo de escape de <i>L. monocytogenes</i> do vacúolo com auxílio de LLO (fonte: Advaxis, 2007).	13

Lista de Tabelas

Capítulo 2

	Página
Tabela 1 Identificação dos pontos de colheita de amostras e suas respectivas proporções	25
Tabela 2 Características bioquímicas das espécies do gênero <i>Listeria</i> (modificado de PAGOTTO et al., 2006)	31
Tabela 3 Pontos contaminados por <i>L. innocua</i> e <i>L. monocytogenes</i>	34

Lista de Figuras

Capítulo 2

	Página
Figura 1 Colheita de amostra de produto - frango após evisceração (P2).	26
Figura 2 Colheita de amostra de manipuladores – Luvas (P7 e P10).	27
Figura 3 Colheita de amostra de superfície de contato - Mesas (P5 e P11).	28
Figura 4 Distribuição das amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i>	38

nos seis grupos de amostras colhidas.

Figura 5 Amostras positivas para *L. monocytogenes* e *L. innocua* 39

Lista de Tabelas

Capítulo 3

Tabela 1 Identificação dos pontos de colheita de amostras e suas respectivas proporções	Página 52
Tabela 2 Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na identificação de <i>L. monocytogenes</i> pela seqüência do 16S rRNA e gene da listeriolisina - hlyA (BUENAVENTURA et al., 2006)	54

Lista de Figuras

Capítulo 3

Figura 1 Mecanismo de escape de <i>L. monocytogenes</i> do vacúolo sem auxílio de LLO (fonte: Advaxis, 2007).	Página 50
Figura 2 Amplificação caracterizando a espécie <i>L. monocytogenes</i> . Linha 1, marcador de peso molecular (DNA ladder); linha 2, controle negativo; linhas 3 a 8, 10, 11, 13 e 14 amostras caracterizadas como <i>L. innocua</i> ; Linhas 9, 12 e 15, amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> com presença de bandas de 314 pb.	56
Figura 3 Distribuição das amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i> .	56
Figura 4 Presença do gene hlyA em cepas de <i>L. monocytogenes</i> não hemolíticas. Linha 1, marcador de peso molecular (DNA ladder); linha 2, controle negativo; linha 3, controle positivo e linhas 4 a 9, <i>L. monocytogenes</i> com presença de bandas de 730 pb.	57

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Panorama da avicultura de corte

O setor avícola brasileiro encontra-se em franca expansão, tanto no cenário nacional como no internacional. O Brasil se consolidou no mercado internacional como o maior exportador mundial de carne de frango, atingindo o montante de 3,6 milhões de toneladas em 2008 (PANORAMA, 2009). Um fator que merece destaque na expansão do mercado avícola refere-se à mudança dos hábitos alimentares dos consumidores, que buscam no consumo de carnes brancas uma alimentação mais saudável. Assim, a população encara o consumo de carne de frango não como uma alternativa de proteína animal de custo mais acessível e sim como um alimento de elevado valor nutricional, com menor concentração de gorduras saturadas e não menos importante, com preços mais atrativos. Colaborando para esta ascensão podemos apontar as diversas crises de confiabilidade que a carne bovina e suína sofre periodicamente.

O brasileiro consome 38,7 Kg de carne de frango por ano o que representa 34% do consumo total de proteína de origem animal, ficando atrás apenas da carne bovina que corresponde a 52% do mercado. Os dados da Associação Brasileira de Produtores de Pinto de Corte – (APINCO, 2008) apontaram um aumento de 32% no consumo per capita de carne de frango entre os anos 2000 e 2008, enquanto a demanda por carne bovina permaneceu estável com a média de 37 kg/hab/ano.

Os investimentos do setor avícola nas últimas décadas em pesquisas nas áreas de nutrição, sanidade, genética e manejo, produziram aves de alto desempenho, mais pesadas, com melhor conversão alimentar e ciclo reduzido.

Em contrapartida, o sistema de criação intensiva em galpões fechados

em alta concentração desencadeou uma série de problemas de bem-estar animal. A restrição de locomoção desencadeou problemas em articulações, músculos e ossos (COSTA, 2003). Esses fatos geraram críticas ao sistema industrial de criação, sensibilizando uma parcela de consumidores que também pautam suas decisões de consumo em sistemas de produção que assegurem responsabilidade social com o meio ambiente, assim como com o bem-estar animal (DEMATTE FILHO et al., 2005).

Além disso, os animais criados em sistemas intensivos tornam-se mais susceptíveis às inúmeras enfermidades, uma vez que o estresse gerado nesses animais em um ambiente de alta concentração desencadeia redução da resposta imune. Nestas condições, esses animais necessitam de doses crescentes de diferentes medicamentos com o objetivo de favorecer a sobrevivência (LIMA, 2005).

No entanto, o uso contínuo de antibióticos, coccidiostáticos e promotores de crescimento vêm gerando preocupações com a segurança alimentar, especialmente com a presença de resíduos químicos nos alimentos e correlacionado à crescente ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos e quimioterápicos utilizados tanto na criação animal, como em terapêuticas humanas (LEE, 2005). Para este autor, a ocorrência de cepas bacterianas multi-resistentes em humanos, identificadas nos últimos anos, geraram especulações quanto à relação “alimentação e saúde dos indivíduos”.

Todar (2008) afirmou que a interrupção do uso de antibióticos como substâncias promotoras de crescimento nos animais de exploração, seria um dos passos mais importantes na batalha contra a resistência bacteriana. Segundo este autor, a utilização de antibióticos na alimentação de animais de exploração com o objetivo de prevenir infecções em vez de curá-las, contribuiu para seleção de bactérias resistentes aos antibióticos e em consequência, diminuiu a eficácia dos mesmos, quando utilizados para combater infecções humanas.

O reflexo de tal preocupação vem sendo observado nas alterações da legislação de países como a Dinamarca em 1998, a União Européia em 2003, Austrália e Japão em 2004, que aboliram a utilização de antibióticos na

produção de frango, passando a exigir análises assegurando a ausência destes nos produtos avícolas que importam (LIMA, 2005).

Diante da redução de credibilidade do sistema convencional de criação, há uma demanda crescente pelo consumo de produtos ecologicamente corretos, alavancando todas as formas de criação e produção alternativas.

O surgimento dos sistemas alternativos

Para abordagem do tema avicultura alternativa, faz-se necessário uma prévia contextualização quanto ao surgimento destes modelos diferenciados do sistema convencional de criação e o esclarecimento das diferentes codificações recebidas.

No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa nº 64 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2008) todos os movimentos de agricultura alternativa, incluindo a Natural, Biodinâmica, Ecológica, Sustentável, Regenerativa, Biológica, Agro-ecológica e Permacultura foram nomeados simplesmente como Agricultura Orgânica. Entretanto, cada um destes modelos de produção apresenta suas particularidades.

O setor agropecuário apresenta uma variedade de classificação atribuída a um mesmo produto alimentício, sendo tal fato em virtude de uma ausência de legislação específica, carência de agências certificadoras de selos de qualidade e também pelo uso indevido, por parte dos produtores, da classificação que os convém (DAROLT, 2001). Desta forma é possível encontrar alimentos comercializados com as seguintes denominações: orgânico, ecológico, natural, biológico entre outros, além do convencional.

Uma vez que a palavra agropecuária não existe no inglês, é pertinente ressaltar que ao referenciar o processo evolutivo da agricultura, esta também engloba a pecuária.

A busca por uma vida mais saudável e por uma alimentação natural teve início no final do século XIX na Alemanha, refletindo uma corrente de pensamento contrário ao desenvolvimento industrial e urbano da época. As

primeiras correntes classificadas como alternativas ao modelo convencional ou industrial surgiram na segunda década do século XX com a Agricultura Biodinâmica, ganhando força nas décadas seguintes em virtude da crescente preocupação da população dos riscos de consumo em longo prazo de alimentos com resíduos químicos. Na década de 30 surgiram na Grã Bretanha e EUA a Agricultura Orgânica; na Suíça e Áustria a Agricultura Organo-Biológica e no Japão a Agricultura Natural. Destas correntes de pensamento, cada uma possuía a sua particularidade, no entanto todas compartilhavam o mesmo interesse, a busca por uma agricultura mais equilibrada e menos agressiva. Cada uma destas correntes de pensamento passou por adequações às teorias iniciais, ressurgindo na década de 70 e renomeados como Agricultura Ecológica, Agricultura Regenerativa, Agricultura Biológica e Permacultura, respectivamente. Assim, estas foram classificadas como Sistemas Alternativos de produção (DAROLT, 2001). A Figura 1 ilustra o processo evolutivo destes sistemas que deram origem à Agricultura Alternativa.

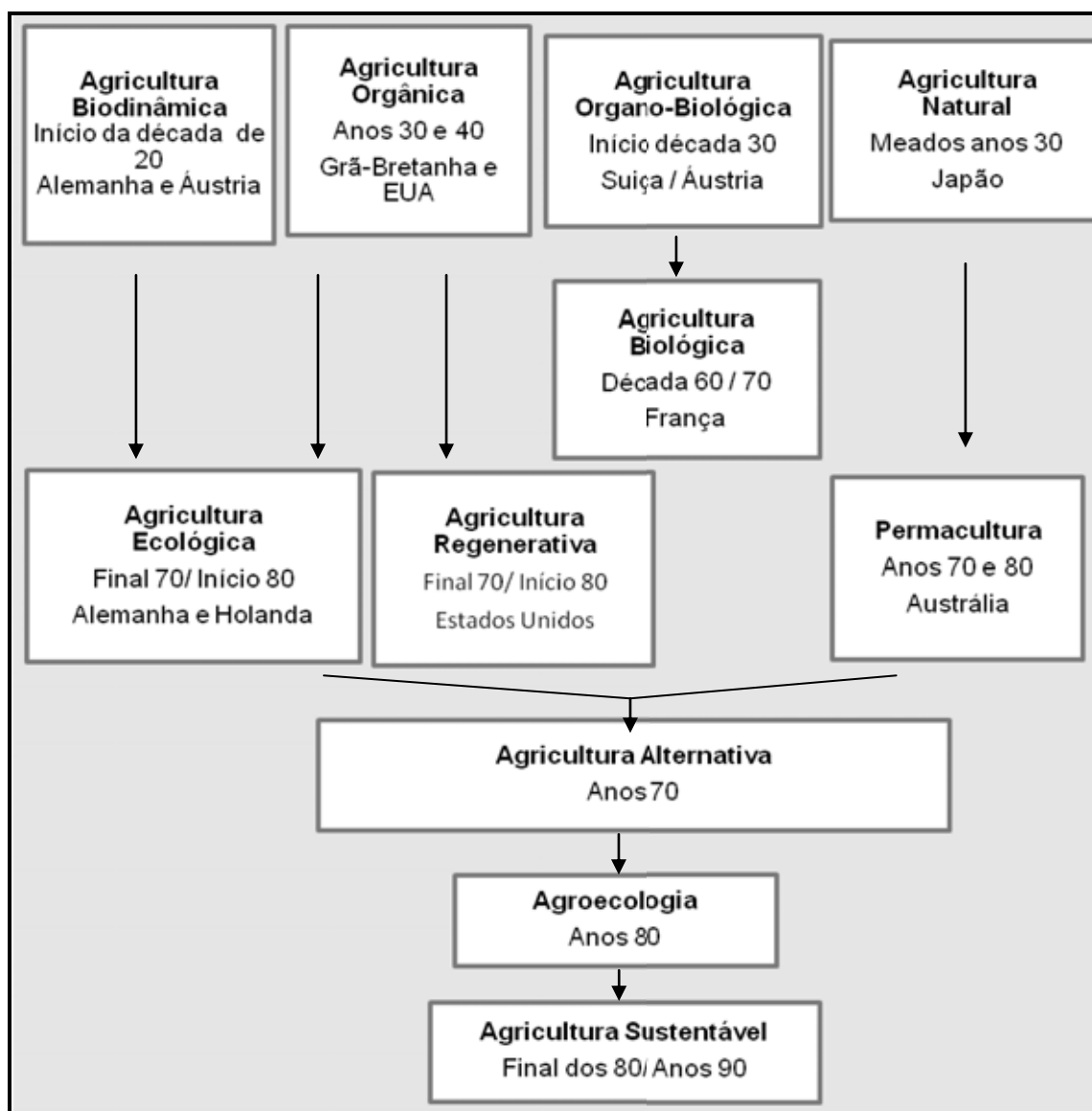


Figura 1 – Principais correntes de pensamento ligados ao movimento e seus precursores (DAROLT, 2001).

No quadro 1 foram relacionados os princípios básicos e as principais particularidades de cada corrente de pensamento que originou a Agricultura Alternativa.

Quadro 1 – Princípios básicos e particulares dos principais movimentos que originaram os métodos orgânicos de produção (DAROLT, 2001).

Movimentos	Princípios Básicos	Particularidades
Agricultura Biodinâmica (ABD)	É definida como uma “ciência espiritual”, onde a propriedade deve ser entendida como um organismo. Preconizam práticas que permitem a interação entre animais e vegetais; respeito ao calendário astrológico biodinâmicos, com objetivo de reativar as forças vitais da natureza. Também consideram outras medidas de proteção e conservação do meio ambiente.	O que mais diferencia a ABD das outras correntes orgânicas é a utilização de alguns preparados biodinâmicos (compostos líquidos de alta diluição, elaborados a partir de substâncias minerais, vegetais e animais) aplicados no solo, planta e compostos, baseados em uma perspectiva energética e em conformidade com a disposição dos astros.
Agricultura Biológica (AB)	Modelo baseado em aspectos socioeconômicos e políticos: autonomia do produtor e comercialização direta. Preocupava-se em proteção ambiental, qualidade biológica do alimento e desenvolvimento das fontes renováveis de energia. Os princípios da AB são baseados na saúde dos solos. Ou seja, uma planta bem nutrida, além de ficar mais resistente a doenças e pragas, fornece ao homem um alimento de maior valor biológico.	Não considerava essencial a associação da agricultura com a pecuária. Recomendam o uso de matéria orgânica, que podem vir de outras fontes externas à propriedade diferindo assim, dos biodinâmicos. No entanto, consideram a integração das propriedades ao conjunto de atividades sócio-econômicas regionais. Segundo as normas, uma propriedade “biodinâmica” ou “orgânica” é também considerada como “biológica”.
Agricultura Natural (AN)	O princípio fundamental é o de que as atividades agrícolas devem respeitar as leis da natureza, reduzindo ao mínimo possível a interferência sobre o ecossistema. Não recomenda o revolvimento do solo, nem a utilização de composto orgânico com dejetos de animais, sendo proibido o uso de esterco animal.	Na prática se utilizam produtos especiais para preparação de compostos orgânicos, chamados de microrganismos eficientes (EM). Esses produtos são comercializados e possuem fórmula e patente detidas pelo fabricante. Esse modelo está dentro das normas da agricultura orgânica.
Agricultura Orgânica (AO)	Baseado na melhoria da fertilidade do solo por um processo biológico natural, pelo uso da matéria orgânica, o que é essencial à saúde das plantas. Como as outras correntes essa proposta é totalmente contrária à utilização de adubos químicos solúveis. Os princípios são, basicamente, os mesmos da agricultura biológica.	Apresenta um conjunto de normas bem definidas para produção e comercialização sendo estas, aceitas e determinadas nacional e internacionalmente. Hoje, o nome “agricultura orgânica” é utilizado em países de origem anglo-saxã, germânica e latina. Pode ser considerada como sinônimo de agricultura biológica, englobando as práticas agrícolas da agricultura biodinâmica e natural.

Assim, o conjunto das correntes apresentadas na Figura 1, a partir da década de 70 recebeu a denominação de sistema alternativo. Desta forma, tal termo não constitui uma corrente ou uma filosofia bem definida, apenas tornou-se útil, para reunir todas as correntes que diferenciavam do sistema tradicional.

Em síntese, classifica-se como avicultura alternativa o sistema em que as aves são criadas em ambiente idêntico as convencionais, porém com densidade inferior, a fim de garantir o bem estar animal e sem nenhuma restrição quanto à linhagem das aves a serem criadas. Recebem alimentação exclusivamente com produtos de origem vegetal, sendo proibida a utilização de antibióticos, anticoccidianos, promotores de crescimento ou ingredientes de origem animal na ração. Segundo Lima (2005), a avicultura alternativa visa à consolidação de um sistema de criação preventiva, sem a necessidade de utilização de métodos profiláticos para garantir a sanidade do plantel.

Para Demattê Filho et al. (2005), a abolição sistemática da utilização de antibióticos e quimioterápicos como promotores de crescimento nas criações animais, que é uma realidade nos países europeus, em breve será também realidade na avicultura industrial brasileira. Para estes autores, em um futuro próximo, os produtos com esse apelo de ausência de resíduos não serão mais produtos diferenciados e sim uma regra.

Contudo, acredita-se que a eliminação destes antibióticos pode favorecer a proliferação de bactérias patogênicas durante o crescimento das aves e assim facilitar a introdução dos mesmos no ambiente de abate e processamento da carne.

Qualidade bacteriana da carne de frango

Assim como qualquer outro produto de origem animal destinado à alimentação humana, a carne de frango pode servir de veículo para inúmeros microrganismos patogênicos como *Salmonella* sp, *Campylobacter* sp, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* entre outros, potencialmente capazes de desencadear enfermidades transmitidas por alimentos (ETA). Desta forma, falhas nas operações de abate, industrialização ou acondicionamento do

produto final podem favorecer a contaminação e a disseminação de vários microrganismos (JOHNSON, 1998).

Dentre os inúmeros microrganismos patogênicos que podem ser veiculados pela carne de frango e seus derivados, *L. monocytogenes*, merece atenção especial. É o agente causador da listeriose, uma zoonose emergente que figura no cenário internacional como uma das mais graves ETA.

***Listeria monocytogenes*: importância em saúde pública**

O gênero *Listeria* compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. welshimeri*, destas, apenas *L. monocytogenes* é considerada patogênica para o homem (VARNAM e EVANS, 1996). Patógeno oportunista, sua presença em alimentos confere sérios riscos à saúde de gestantes, recém nascidos, idosos e indivíduos imunocomprometidos, devido a sua alta mortalidade (JANZTEN et al., 2006).

A presença de *L. monocytogenes* tem sido relatada em diferentes alimentos como leite cru e ou pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais, embutidos de carne, carne de frango, pescados crus ou defumados (RORVIK e YNDESTAD, 1991; NORRUNG et al., 1999; PETERSEN e MADSEN, 2000).

Este microorganismo vem recebendo uma atenção especial da comunidade científica nas últimas décadas, em virtude de sua habilidade em se desenvolver em temperaturas baixas, permitindo assim sua multiplicação em alimentos refrigerados (PETERSEN e MADSEN, 2000; DESTRO, 2000).

Assim, enquanto a refrigeração constitui obstáculo para a maioria dos patógenos, *L. monocytogenes* encontra nos produtos de origem animal, armazenados sob refrigeração um ambiente com baixa competição para multiplicação, fazendo destes, o substrato ideal para este patógeno.

Segundo dados do centro americano de controle e prevenção de doenças, (CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC), listeriose é a quarta principal causa de infecções alimentares nos Estados Unidos (depois de *Campylobacter*, *Salmonella* e *Escherichia coli*), porém sua taxa de mortalidade é a mais alta. A última estimativa do CDC realizada em

1997 indicou a ocorrência de 2500 casos de listeriose apenas nos EUA, dos quais 90% geraram hospitalizações e 20% destes indivíduos foram a óbito. No entanto, houve uma redução dos números de casos registrados nos EUA em 36% revelado em pesquisa realizada entre os anos de 1996 e 2006 (CDC, 2007). No Brasil e em outros países em desenvolvimento não há estatísticas oficiais de casos de listeriose, uma vez que sua notificação não é obrigatória.

L. monocytogenes se comporta de maneira diferenciada dos demais patógenos responsáveis por ETA. Em pessoas saudáveis, a infecção pode ser assintomática ou apresentar-se com sintomas semelhantes a uma gripe acompanhados ou não de febre (RYSER e MARTH, 1999) ou quadros gastroentéricos GLASER et al., 2001; LEE, 2005). Entretanto, uma parcela representativa da população pertence ao grupo de risco, de indivíduos que quando expostos, tendem a apresentar um quadro clínico grave, podendo levar a óbito. Pertencem a este grupo as mulheres grávidas, os recém nascidos, idosos e indivíduos imunocomprometidos (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

A probabilidade de mulheres grávidas contraírem a listeriose é 20 vezes superior a de adultos saudáveis e em pessoas com o sistema imune debilitado essa probabilidade aumenta 300 vezes (CDC, 1998). Apesar de incomum, a ocorrência de listeriose humana é de alta relevância clínica, em razão da alta mortalidade e severidade do quadro clínico (GLASER et al., 2001; JANZTEN et al., 2006). A taxa de letalidade em recém nascidos é de 30%; em adultos 35%, variando de 11% para menores de 40 anos e 63% para maiores de 60 anos. Em quadros de septicemia, esta taxa sobe para 50% e nos casos associados à meningite, para 70% (VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Não há um consenso entre os pesquisadores a respeito da dose infectante, podendo ser inferior a 10^2 UFC em alguns casos. Segundo a FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA (1999), a dose infectante pode variar conforme a virulência da cepa e a susceptibilidade da vítima.

Uma característica peculiar com relação a este patógeno refere-se ao longo período de incubação, podendo levar semanas após a exposição para que a infecção se manifeste. De acordo com o CDC (1998), o período de incubação mediano está estimado em três semanas. Entretanto, Campos

(2005) estabeleceu um período de incubação distinto, variando de 20 horas após a ingestão de alimentos contaminados para os casos de gastroenterite e de 20 a 30 dias, em casos de doenças invasivas. O longo período de incubação torna-se um agravante ao diagnóstico e notificação desta enfermidade as autoridades de saúde.

Outra diferença de *L. monocytogenes* para outras ETA refere-se a sua capacidade de sobreviver às defesas não específicas do sistema imunológico, adquiridas por sua habilidade de sobreviver e multiplicar-se no interior das células fagocitárias do hospedeiro. Assim, a natureza intracelular facultativa, associada à sua habilidade de desencadear um quadro septicêmico, auxilia na disseminação e instalação da infecção em tecidos normalmente não afetados como o sistema nervoso central, a placenta e o útero gravídico (FARBER e PETERKIN, 1991; RYSER e MARTH, 1999).

A predileção de *L. monocytogenes* por estes locais aumenta a relevância das pesquisas deste patógeno na área de alimentos, em especial, devido à severidade dos quadros clínicos desencadeados como, aborto no terço final da gestação ou o nascimento de fetos com problemas neurológicos, meningites, septicemia neonatal ou natimortos (VARNMAN e EVANS, 1996; CDC, 1998). Tal severidade foi confirmada pelos pesquisadores Schwab e Edelweiss (2003), que analisaram 10 placentas provenientes de abortos ou partos prematuros no Hospital das Clínicas de Porto Alegre no ano 2000, isolando *L. monocytogenes* em cinco de dez (50%) amostras.

Casos de meningite por *L. monocytogenes* foram relatados por Hofer et al. (1998), no Rio de Janeiro, em dois adultos e um recém nascido e por Leme-Marquez et al. (2004), na região de Campinas-SP, em nove pacientes, sendo oito adultos e um recém-nascido.

Também são enquadrados como grupo de risco para listeriose os indivíduos submetidos a transplantes. Estes recebem imunossupressores por um longo período, com o objetivo de evitar rejeição do órgão recém transplantado, gerando uma acentuada queda na imunidade destes indivíduos, tornando-os mais susceptíveis às bactérias oportunistas. Hofer et al. (1999),

identificaram cinco casos de listeriose em pacientes submetidos a transplante renal em um hospital de São Paulo.

Com relação aos manipuladores de alimentos, algumas pesquisas sugerem que até 21% dos humanos sejam portadores desta bactéria nos intestinos (MASCOLA et al., 1992; SLUTSKER e SCHUCHAT, 1999), de forma assintomática. Em uma pesquisa realizada na cidade de Uberaba-MG com 445 manipuladores de alimentos, empregando antisoro anti-listeria, Tavares-Neto et al. (1996), constataram que 17,1% destes, apesar de sadios, apresentaram anticorpos para *L. monocytogenes*.

Mecanismos de patogenicidade

São vários os fatores de virulência utilizados pela *L. monocytogenes* para sobreviver às defesas do sistema imune do hospedeiro. No entanto, nesta pesquisa abordaremos apenas os fatores de virulência relacionados ao caráter intracelular facultativo deste patógeno. Assim, o processo de entrada em células não fagocíticas de mamífero ocorre via internalina-E-caderina.

Em uma primeira etapa a internalina, proteína de invasão presente na membrana do patógeno, interage com a E-caderina, uma molécula de adesão expressa especificamente em células epiteliais, que se conecta ao citoesqueleto promovendo a internalização. A E-caderina funciona como um receptor e promove a entrada da bactéria para o interior da célula. Nesta etapa, *L. monocytogenes* encontra-se restrita em um fagossomo, no interior de macrófagos do hospedeiro, a qual pela lógica do sistema imune deveria ser digerida e eliminada do organismo hospedeiro (GLASER et al., 2001). Entretanto, escapa rapidamente do vacúolo do hospedeiro e cresce diretamente no citosol (Figura 2). Esta habilidade em driblar as respostas do sistema imune do indivíduo frente a uma infecção, está relacionada a uma série de fatores de virulência expressos ou não, em razão de complexas inter-relações entre hospedeiro-agente (LIU et al., 2006).

Várias observações sugerem que *L. monocytogenes* apresente virulência heterogênea, em função dos sorotipos, os quais estariam

associados, de alguma forma, com o potencial de patogenicidade do microrganismo (CAMPOS, 2005). As cepas de virulência variada ocorrem em razão de diferentes determinantes antigênicos expressos na superfície celular, incluindo ácidos lipoproteicos, proteínas de membrana e organelas extracelulares como os flagelos e as fímbrias. Todavia, qualquer cepa de *Listeria monocytogenes* pode ser considerada potencialmente patogênica para humanos (GLASER et al., 2001).

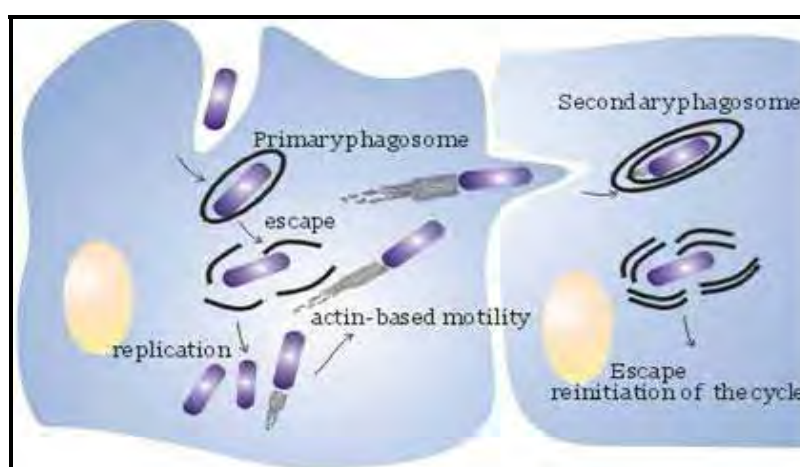


Figura 2 - Esquema de ciclo intracelular de *L. monocytogenes* (fonte: VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Já a listeriolisina O (LLO), codificada pelo gene *hlyA*, é a principal responsável pelo escape da bactéria do vacúolo e sua entrada no citosol. LLO é membro de uma grande família de hemolisinas formadoras de poros secretadas por patógenos Gram positivos, que inclui a estreptolisina O (SLO) secretada por *Streptococcus pyogenes* e a perfringolisina (PFO) secretada por *Clostridium perfringens*. Todos os membros desta família parecem ter mecanismos semelhantes de ação; ligando-se com moléculas de colesterol presentes na membrana do hospedeiro e formando os poros (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Dentre as características particulares da LLO, esta apresenta uma meia-vida relativamente curta no citosol, onde parece também não ser traduzida de forma eficiente, apesar dos altos níveis transcritos de *hly* detectados na bactéria, além disso, seu pH ótimo é ácido. Juntos, estes fatores

parecem tornar LLO pouco tóxica no citosol, permitindo a sobrevivência da célula hospedeira (LIU et al., 2006).

De acordo com Campos (2005), após a internalização, a LLO é sintetizada e rapidamente se liga ao colesterol presente na membrana. A formação de poros atinge o auge quando o pH do fagossomo encontra-se entre 5,5 e 6,0. Uma vez formado os poros, há uma elevação do pH vacuolar, interrompendo o processo de maturação do vacúolo, permitindo que as PLCs de *L. monocytogenes* e do hospedeiro, realizem a dissolução da membrana do vacúolo (Figura 3).



Figura 3 - Mecanismo de escape de *L. monocytogenes* do vacúolo, com auxílio de LLO (fonte: Advaxis, 2007).

Ainda, no citosol da célula hospedeira, *L. monocytogenes* é encapsulada por filamentos de actina e após algumas divisões celulares começa a se movimentar. Essa capacidade de movimento no interior do citosol é dependente da polimerização de moléculas de actina do hospedeiro, sendo tal habilidade determinada por uma proteína, a ActA, expressa na superfície da *L. monocytogenes* (FRANCO e LANDGRAF, 2005). Assim, falhas na expressão da proteína de superfície ActA, determinam a capacidade de invasão de células adjacentes e conseqüentemente instalação de um quadro de infecção.

De acordo com a revisão de literatura acima descrita, ressaltando a importância em saúde pública de *L. monocytogenes* e a presença desta na cadeia produtiva de frangos convencionais, esta tese teve como objetivo inicial,

pesquisar a presença deste patógeno no ambiente de abate de frangos alternativos, assim como no produto final.

O capítulo 2, intitulado **Ocorrência de *L. monocytogenes* em frangos alternativos** teve como objetivo determinar a incidência do referido patógeno nas diversas etapas de abate de frangos alternativos.

O capítulo 3 intitulado **Cepas não hemolíticas de *Listeria monocytogenes* isoladas em ambiente de abate de frangos alternativos** teve como objetivo comparar a metodologia convencional de isolamento de *L. monocytogenes* com a metodologia molecular por PCR.

Os trabalhos foram escritos segundo as normas da **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADVAXIS. The Technology Center of New Jersey. **Why Listeria?**. New Jersey, 2007. Disponível em: <<http://www.advaxis.com>>. Acesso em: 6 out. 2008.

APINCO. Produção de carne de frango. **Produção Animal: Avicultura**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 26-30, 2007. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/economia/prodfran.asp>>. Acesso em: 22 ago. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 64, de 18 de dezembro de 2008. Aprova o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal/vegetal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 64, p. 21, 19 dez. 2008. Seção 1.

CAMPOS, L. C. *Listeria monocytogenes*. In: TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. 4 ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 29, p. 235 - 242.

CENTERS OF DISEASE CONTROL. **Listeriosis**: media relations. Atlanta: Department of Health and Human Services, 1998. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeriosis.html>> Acesso em: 6 nov. 2008.

_____. **Listeriosis**: technical information. Atlanta: Department of Health and Human Services, 2007. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_ti.html#trends> Acesso em: 6 nov. 2008.

COSTA, M. J. R. P. Comportamento e bem-estar de frangos em granjas comerciais. **Agroecologia Hoje**, v. 3, n. 18, p. 14-15, jan./fev. 2003. Disponível em: <<http://www.taps.org.br/Paginas/Agroecologia.html>>. Acesso em: 27 nov. 2006.

DAROLT, M. R. **As principais correntes do movimento orgânico e suas particularidades**. [São Paulo]: Planeta Orgânico, 2001. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/traballos.htm>>. Acesso em: 27 nov. 2006.

DEMATTÊ FILHO, L. C., et al. **Produção de frango orgânico: desafios e perspectivas**. [São Paulo]: Planeta Orgânico, 2005. Disponível em:

<<http://www.planetaorganico.com.br/trabfrango.html>>. Acesso em: 27 nov. 2006.

DESTRO, M. T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 191-196, 2000.

FARBER, J. M.; PETERKIN P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook: *Listeria monocytogenes*. **Bad Bug Book**, 1999. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov/~mow/chap6.html>>. Acesso em: 24 ago. 2009.

FRANCO, B. D. G. H.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

GLASER, P., et al. Comparative genomics of *Listeria* species. **Science**, v. 294, p. 849-852, Oct. 2001.

HOFER, E., et al. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 173-177, 1998.

HOFER, C. B., et al. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 375-377, 1999.

JANZTEN, M. M., et al. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real time PCR. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 235-247, 2006.

JOHNSON, J.L. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from meat, poultry and egg products. In: **USDA-FSIS Microbiology Laboratory guidebook**. 3 ed., v.1, 1998.

LEE, R. M. Control of *L. monocytogenes* in RTE meat products. In: SYMPOSIUM OF *LISTERIA* HYSTERIA, 2005. **Palestra**: Disponível em: <<http://www.uoguelph.ca/crifs/%20Symposium%202005/Presentations/Lee>>. Acesso em: 30 jan. 2009.

LEME-MARQUES, E. G., et al. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de casos clínicos en la región de Campinas-SP, Brasil. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 17., 2004, Buenos Aires. **Anais...** Argentina, 2004.

LIMA, A. **Antibióticos na nutrição animal**. [Ipeúna]: Informativo AVAL, 2005. Disponível em: <<http://www.aval.org.br>>. Acesso em: 20 out. 2008.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *L. monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of medical microbiology**, v. 55, p. 645-659, 2006.

MASCOLA, L., et al. Fecal carriage of *Listeria monocytogenes*: observations during a community-wide, common-source outbreak. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 557-558, 1992.

NORRUNG, B., et al. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 195-203, 1999.

PANORAMA do frango de corte. São Paulo: AVISITE, 2009. Apresenta informações especializadas em avicultura. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/economia/prodfran>>. Acesso em: 21 maio 2009.

PETERSEN, L.; MADSEN, M. *Listeria* spp. in broiler flocks: recovery rates and species distribution investigated by conventional culture and the EiaFoss method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, p. 113-116, 2000.

RORVIK, L. M., YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. **International Journal of Food Microbiology** v. 13, p. 97-104, 1991.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. ***Listeria*, Listeriosis, and food safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999. 738 p.

SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M. I. A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunohistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 2, p. 111-114, 2003.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed). ***Listeria, Listeriosis and food safety***. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 75-95.

TAVARES-NETO, J., et al. Inquérito soro-epidemiológico antilisteria em Uberaba, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 1, p. 41-45, 1996.

TODAR, K. Principles of bacterial pathogenesis: bacterial resistance to antibiotics. In: TODAR, K. **Todar's online textbook of bacteriology**. Wisconsin: 2008. Não paginado. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net>>. Acesso em: 18 nov. 2008.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. *Listeria monocytogenes*. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. Londres: Marison, 1996. chap. 16, p. 327-345.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., et al. *Listeria*: pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, p. 584-640, 2001.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

CAPÍTULO 2

**OCORRÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* NO
PROCESSAMENTO DE FRANGOS ALTERNATIVOS.**

OCORRÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* NO PROCESSAMENTO DE FRANGOS ALTERNATIVOS

Cleise de Oliveira SIGARINI^{2*}; Roberto de Oliveira ROÇA³; José Paes de Almeida NOGUEIRA PINTO⁴, Ricardo Ichiro SAKATE⁵, André MATOS⁶

RESUMO

O Brasil é um dos principais países produtores/exportadores e consumidores de carne de frango no mundo. A maioria das aves é criada tradicionalmente, porém uma parte já é produzida pelo método alternativo que preconiza o bem-estar das aves sem o uso de antibióticos, coccidiostáticos, promotores de crescimento e ração de origem animal. No entanto, devido à ausência de inibidores exógenos, bactérias patogênicas podem se disseminar sem restrição na granja, sendo levadas ao abatedouro, contaminando não só o ambiente de abate, mas também o produto destinado ao consumidor final. Uma destas bactérias, *Listeria monocytogenes* é um microrganismo ubíquo que provoca a listeriose, doença zoonótica grave que leva a aborto/natimortos, neuropatias, gastroenterites, principalmente em crianças e idosos. É portanto, de fundamental importância que conheçamos a prevalência desta bactéria da recepção das aves no abatedouro até o acondicionamento do produto final, para que possamos orientar com precisão os principais focos de contaminação. Assim, foram colhidas 230 amostras sendo estas, obtidas em ambientes, equipamentos, utensílios e em carcaças de frango em diferentes etapas de abate e processamento de frangos alternativos. As amostras foram analisadas pela técnica convencional de isolamento de *L. monocytogenes* e posterior confirmação por técnica molecular. De um total de 230 amostras analisadas, 12 foram confirmadas como *L. monocytogenes*, representando 5,21% do total de amostras colhidas em diferentes pontos do fluxograma de abate. Assim, do total de amostras positivas (12), apenas duas (3,33%) destas foram identificadas no produto final (cortes embalados).

Palavras-chave: Criação alternativa, *Listeria monocytogenes*, abate de aves, microbiologia de alimentos.

¹ Recebido em

^{2*} Doutoranda do Programa de Pós-Graduação - UNESP, Botucatu. SP. Brasil. E-mail: cleisesigarini@ibest.com.br

³ Prof. Adj. do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial da FCA – UNESP, Caixa Postal, 237. CEP 18.603-970. Botucatu. SP. Brasil. Pesquisador do CNPQ. E-mail: robertoroca@fca.unesp.br

⁴ Prof. Ass. Dr. do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - UNESP, Caixa Postal 572. CEP 18.618-000. Botucatu. SP. Brasil.

⁵ Fiscal Federal Agropecuário. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasília – DF.

⁶ Aluno de Graduação do Curso de Medicina Veterinária - UNESP. Botucatu - SP.

OCCURRENCE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN ALTERNATIVE POULTRY PROCESS.

Cleise de Oliveira SIGARINI^{2*}; Roberto de Oliveira ROÇA³; José Paes de Almeida NOGUEIRA PINTO⁴, Ricardo Ichiro SAKATE⁵, André MATOS⁶

SUMMARY

Brazil is one of the major producers/exporters and consumers of chicken meat in the world. Chicken production has been mainly based on confinement systems, although many animals have been raised in alternative systems, which focuses animal welfare, antibiotic-free animal production, with no coccidiostatic drugs or growth promoters or food of animal origin. However the absence of exogenous inhibitors could potentially spread pathogenic bacteria to the farm and then to the slaughterhouse, contaminating not only the environment of slaughter, but also the final product. One of these bacteria, *Listeria monocytogenes*, is an ubiquitous pathogen which causes listeriosis, a severe zoonotic disease that leads to abortion/ stillbirth, neuropathy, gastroenteritis, mainly in children and elderly people. Therefore, the identification of sources of this bacterium in poultry slaughterhouses and in the final product is very important. A total of 230 samples were collected from the slaughterhouse environment, equipment, utensils and carcasses in different stages of slaughtering and chicken processing. Samples were analyzed using the conventional technique for isolation of *L. monocytogenes*. Confirmation was achieved using molecular technique. Only 12 out of 230 samples were positive for *L. monocytogenes* which represent 5.21% of the samples from this slaughterhouse. Only two samples (3.33%) from the final product were positive for this pathogen.

Keywords: Alternative system, *Listeria monocytogenes*, poultry slaughtering, food microbiology.

1 - INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um dos microrganismos mais problemáticos para a indústria de alimentos mundialmente, por sua capacidade de colonizar superfícies de equipamentos, formando biofilme e favorecendo sua disseminação aos demais setores da indústria (COLVARA et al., 2008).

Por ser um microrganismo ubiqüitário, isolado no solo, água, silagem, vegetais e outras fontes ambientais, torna-se extremamente difícil restringir as fontes de contaminação nas diferentes etapas de processamento de alimentos. A disseminação deste patógeno na indústria alimentícia é favorecida por sua tolerância aos efeitos deletérios do congelamento, desidratação, acidez e altas temperaturas, apesar de sua incapacidade de formar esporos (PERRY e DONNELLY, 1990; RYSER e MARTH, 1999; DYKES e MOORHEAD, 2000). Enquanto a refrigeração constitui obstáculo para a maioria dos patógenos, *L. monocytogenes* encontra um ambiente com baixa competição para multiplicação, em produtos de origem animal armazenados sob refrigeração.

Lage (1993); Kabuki (1997) e Pelisser et al. (2001) colheram amostras de carne de frango resfriada do comércio varejista em diferentes estados brasileiros, e analisaram quanto à presença de *Listeria* spp e *L. monocytogenes*. Resultados muito semelhantes foram verificados por estes autores, entre 90% a 100% de contaminação por *Listeria* spp. Quanto à contaminação por *L. monocytogenes* houve uma variação de 4,4% a 60% de positividade.

No município de Niterói, RJ, Gonçalves (1998) colheu 40 amostras de cortes de peito de frango congelados provenientes de estabelecimentos comerciais. As análises foram realizadas durante os meses de maio a dezembro de 1997 e das amostras analisadas, 100% das amostras apresentaram-se positivas para *Listeria* spp., sendo que 50% das amostras estavam contaminadas com *L. monocytogenes*.

O nível de contaminação de carne de frango, inteiro e resfriado, para *Listeria* spp e para *Listeria monocytogenes* também foi avaliado por Mendes (2000) em Florianópolis, durante o período de maio a julho de 1999 e isolou-se

Listeria spp foi isolada em 37,5% das amostras analisadas. Destas, 27,1% foram identificadas como *Listeria monocytogenes*, 2,1% como *Listeria innocua*, 6,2% como *Listeria seeligeri* e 2,1% como *Listeria welshimeri*.

A maioria dos trabalhos nacionais identificando a presença de *L. monocytogenes* em frango aponta um alto nível de contaminação por este patógeno (NUNES, 1994; GONÇALVES et al., 2001; ARAGON et al., 2003). No entanto, estas pesquisas se restringem a amostras colhidas somente no comércio varejista, tornando-se difícil a identificação dos pontos de contaminação e disseminação do patógeno na cadeia produtiva do frango de corte. Identificar a contaminação do produto final torna-se de maior relevância, quando se identifica qual elo da cadeia produtiva em questão é falho e pode ser melhorado.

Rodrigues et al. (2002), pesquisando a distribuição deste microrganismo em uma linha de processamento de *nuggets* congelados de frango, constataram que das 413 amostras analisadas, 271 (65,6%) foram positivas para *Listeria* spp e 249 amostras (60,1%) eram *L. monocytogenes*.

Portanto, com base na literatura nacional e internacional, observa-se que *L. monocytogenes* pode estar presente no abate e processamento contaminando direta ou indiretamente a carne de frango. Porém até o presente, nenhum estudo, em nível nacional, foi publicado apresentando os riscos associados à presença de *L. monocytogenes* no abate e processamento de frangos alternativos o que torna difícil uma definição prévia de resultados e uma comparação posteriormente com resultados de estudos similares.

Diante da relevância em saúde pública de *L. monocytogenes* e de diferentes pesquisas identificando a presença deste patógeno em carne de frango e derivados, o presente trabalho tem como objetivo verificar a ocorrência de *L. monocytogenes* em carcaças e cortes de frangos, submetidos ao sistema de criação alternativa. A hipótese desta pesquisa fundamenta-se na exclusão de antibióticos, coccidiostáticos e promotores de crescimento na dieta desses animais. Assim, aventa-se uma maior susceptibilidade destes animais a contaminação por *L. monocytogenes* e a conseqüente disseminação deste no ambiente de abate e no produto final.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

São classificadas como alternativas as aves criadas em ambiente idêntico ao convencional, porém com densidade inferior, a fim de garantir o bem estar animal. Sem nenhuma restrição quanto à linhagem das aves a serem criadas, recebem uma alimentação exclusivamente com produtos de origem vegetal, sendo proibida a utilização de antibióticos, anticoccidianos, promotores de crescimento ou ingredientes de origem animal na ração.

Um total de 230 amostras foram colhidas em um abatedouro localizado no Estado de São Paulo e destinado exclusivamente ao abate de frangos alternativos. Sob o regime de fiscalização federal e um volume de abate de 10.000 frangos /dia, a planta frigorífica trabalha com avicultores em sistema de integração, fornecendo aos mesmos pintainhos de um dia de idade, insumos e assistência técnica até que as aves atinjam idade de abate.

Foram realizadas dez visitas ao referido estabelecimento, sendo em cada uma destas, colhidas 23 amostras, em 14 diferentes pontos, perfazendo um total de 230 amostras (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação dos pontos de colheita de amostras e suas respectivas proporções.

Identificação/ pontos	Pontos de colheita	Identificação / amostras	Amostras colhidas/ visita	Total de amostras colhidas
P1	Carcaça - Após a sangria	A1 e A2	02	20
P2	Carcaça - Após evisceração	A3 e A4	02	20
P3	Carcaça - Após o <i>chiller</i>	A5 e A6	02	20
P4	Cortes armazenados em câmara fria	A7 e A8	02	20
P5	Mesa inox (sala de evisceração)	A9	01	10
P6	Água do Chiller	A10	01	10
P7	Luvas (sala de evisceração)	A11 e A12	02	20
P8	Faca (sala de evisceração)	A13	01	10
P9	Faca (desossa)	A14	01	10
P10	Luva (desossa)	A15	01	10
P11	Mesas (desossa)	A16 e A17	02	20
P12	Ralo (desossa)	A18	01	10
P13	Bandeja p/ armaz. Prod. câmara fria	A19	01	10
P14	Cortes embalados	A20; A21; A22 e A23	04	40

P = Pontos

A = Amostra

A determinação de *L. monocytogenes* foi realizada com adaptação da metodologia preconizada pela USDA - United States Departamento of Agriculture (UNITED STATES, 2008) para a técnica convencional. Já para a reação da cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes Mono5-F, Mono7-F (forward) e Lis-R (reverse), estabelecido por Somer e Kashi (2003), sendo cada etapa descrita detalhadamente a seguir.

Todas as amostras com perfil bioquímico característico para *L. monocytogenes* e *L. innocua* foram estocadas e posteriormente submetidas à técnica molecular de PCR, uma vez que a única diferença entre estas espécies encontra-se na capacidade, de apenas a primeira causar beta hemólise em ágar sangue de carneiro e ou eqüino.

2.2 – MATERIAL

2.2.1 – Carcaças e Cortes

Foram amostradas pela técnica de enxágüe duas carcaças de frango, escolhidas aleatoriamente, após as etapas de sangria, evisceração e imediatamente após a saída dos resfriadores contínuos (*chillers*).

Cada carcaça foi acondicionada, individualmente, em saco plástico de alta resistência e posteriormente vertido sobre a mesma 300 mL de solução salina estéril (0,85% de NaCl). Para a obtenção da alíquota a ser analisada, cada carcaça foi vigorosamente massageada por três minutos e em seguida devolvida a linha de processamento (Figura 1). O material de enxágüe foi devidamente lacrado, identificado e armazenado em caixa isotérmica com gelo.



Figura 1 - Colheita de amostra de produto – frango após a evisceração (P2).

Procedimento semelhante foi realizado para obtenção das amostras de cortes armazenados em câmara fria. As amostras colhidas nesta etapa representavam os cortes do abate do dia anterior.

2.2.2 - Amostras de água

Para colheita das amostras de água foram utilizados recipientes estéreis contendo tiosulfato de sódio a 1%, próprio para coleta de água. Aplicou-se a técnica de imersão, colhendo 100 mL de água na parte final do tanque de resfriamento contínuo.

2.2.3 - Luvas dos Manipuladores

Foram obtidas amostras em repetição das luvas de funcionários dos setores de evisceração e também uma amostra obtida na sala de desossa. As mãos dos funcionários foram enxaguadas e massageadas com 200 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) durante um minuto (Figura 2). O material resultante do processo de enxágüe foi devidamente lacrado, identificado e armazenado em isopor com gelo até o início das análises laboratoriais.



Figura 2 - Colheita de amostra de manipuladores – Luvas (P7 e P10).

2.2.4 - Superfície em contato com o alimento

Foram colhidas amostras da superfície de bandejas plásticas utilizadas para o armazenamento de produtos, mesas de inox da sala de evisceração e desossa. Estas foram obtidas com auxílio de moldes de aço inox de 10 X 10

cm (totalizando 100 cm²) e de gazes, previamente esterilizadas e embebidas em 10 mL de solução salina (Figura 3).



Figura 3 - Colheita de amostra de superfície de contato – Mesas (P5 e P11).

Amostras das facas dos setores de evisceração e desossa, também foram colhidas com auxílio de gaze embebida em 10 mL de solução salina, em toda a sua superfície.

Todas as amostras obtidas com auxílio de gazes foram armazenadas individualmente, em bolsas plásticas apropriadas para colheita de amostras, identificadas e acondicionadas em isopor com gelo reciclável, até o momento da pesquisa bacteriológica.

2.3 - MÉTODOS

2.3.1 - Metodologia Tradicional

Para o isolamento e identificação de *L. monocytogenes*, adotou-se a metodologia revisada do USDA (UNITED STATES, 2008), sendo esta, subdividida nas seguintes etapas: enriquecimento seletivo primário, enriquecimento seletivo secundário, plaqueamento seletivo diferencial, purificação e confirmação bioquímica.

2.3.1.1 - Enriquecimento seletivo primário

Após prévia homogeneização da amostra obtida por enxágüe, retirou-se uma alíquota de 25 mL, sendo a mesma vertida assepticamente em bolsa plástica acrescida de 225 mL de caldo University of Vermont Medium (UVM) e imediatamente incubada em estufa a 30°C/ 24 horas.

Para as amostras colhidas com auxílio de gaze, foram acrescidas de 90 mL de caldo UVM e após homogeneização, também foram incubadas a 30°C por 24 horas. A etapa de pré-enriquecimento utilizada tem como objetivo repor as condições fisiológicas das bactérias injuriadas.

2.3.1.2 - Enriquecimento seletivo secundário

Após o prévio período de incubação, retirou-se 0,1 mL do Caldo UVM, vertendo a alíquota em tubo contendo 10 mL de caldo Fraser, acrescido de seus suplementos inibidores de bactérias Gram negativas, sendo estes, acriflavina, ácido nalidíxico, citrato férrico amoniacal. O sub-cultivo após homogeneização foi incubado a 35°C/24 até 48 horas, sendo esta etapa denominada de enriquecimento seletivo. As amostras que apresentaram coloração enegrecida após o período de incubação foram consideradas positivas para *Listeria*, devido a hidrólise da esculina em esculetina e glicose por ação da enzima beta-D-glicosidade. A esculetina ao entrar em contato com o ácido férrico amoniacal, presente no meio forma um complexo enegrecido, alterando a coloração do meio de levemente amarelado para enegrecido.

2.3.1.3 - Plaqueamento seletivo diferencial

As amostras consideradas positivas foram semeadas por esgotamento em ágar Oxford modificado e ágar base Palcam, sendo em ambos acrescidos suplementos seletivo para listeria. As placas foram incubadas a 35°C/ 48 horas, dando início a etapa de plaqueamento seletivo. As bactérias do gênero *Listeria*

apresentam comportamento bioquímico semelhante em ambos meios, com colônias circulares, acompanhadas de um halo preto de hidrólise da esculina.

2.3.1.4 - Purificação

De cada placa de ágar Oxford e de ágar Palcam foram colhidas de três a cinco UFC características e a seguir semeadas em placas contendo ágar tripticase de soja, suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE). Estas foram incubadas por 24 horas a 37°C, com a finalidade de isolamento e purificação da UFC colhida. A identificação de UFC característica nesta etapa, realizou-se sob iluminação inclinada transmitida a 45°, facilitando a visualização de colônias azuis esverdeadas e ou de aspecto de vidro moído.

2.3.1.5 - Identificação bioquímica

De cada placa de TSA-YE com crescimento característico, retirou-se uma colônia isolada, transferindo-a em toda a superfície inclinada do ágar TSA-YE em tubo e posteriormente incubado a 35°C/24 horas. Esta etapa antecede as provas bioquímicas, com a finalidade de manter o inóculo celular em fase de crescimento logarítmico, caracterizada por intensa divisão celular, garantindo a utilização apenas de culturas jovens.

A partir do sub-cultivo em ágar TSA-YE, realizou-se as seguintes provas bioquímicas: ágar púrpura de bromocresol adicionado dos carboidratos, manitol, xilose, dextrose e ramnose; ágar sangue de cavalo 5% e ágar motilidade. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e o teste da motilidade a 25°C por até 7 dias (JOHNSON, 1998). Foram consideradas positivas para *Listeria monocytogenes* as amostras que apresentaram comportamento bioquímico segundo Pagoto et al. (2006) (Tabela 2).

Cada amostra suspeita foi inoculada em caldo tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) e incubada a 35°C por 24 horas. Após o crescimento, adicionou-se uma alíquota de óleo mineral estéril, a fim de garantir a integridade celular bacteriana durante a etapa de

estocagem em freezer, para posterior emprego de técnica molecular.

Tabela 2 – Características bioquímicas das espécies do gênero *Listeria* (modificado de PAGOTTO et al., 2006)

Espécie	Dextrose	Xilose	Ramnose	Manitol	β –hemólise
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	+	-	d ^a	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	-	+
<i>L. welshimeri</i>	+	+	D	-	-
<i>L. grayi</i>	+	-	-	+	-
<i>L. murrayi</i>	+	-	D	+	-

a Símbolo padrão: +, ≥ 90% positivo; -, ≥90% negativo; d, 11-89% das cepas são positivas.

b Nem todas as cepas de *L. monocytogenes* exibem β-hemólise – a cepa ATCC 15313 não é hemolítica em sangue de cavalo, carneiro e bovino.

c Um halo fraco ou múltiplos halos de hemólise são exibidos pelas cepas de *L. ivanovii*.

2.3.2 - Metodologia molecular

2.3.2.1 - Extração do DNA bacteriano

Após prévio período de descongelamento, procedeu-se a homogeneização vigorosa de cada sub amostra, seguida da obtenção de uma alíquota de 500 µL de cada. Estas foram centrifugadas a 100 rpm por cinco minutos, com o objetivo de separar as células bacterianas do caldo de estocagem. Após descarte do sobrenadante e extração máxima do caldo de estocagem, adicionou-se ao pool celular restante 100 µL de água ultra pura estéril, seguido de homogeneização intensa para posterior extração do DNA por lise térmica, descrito por Sambrook e Russel (2001).

Assim, o procedimento anteriormente citado refere-se na re-suspensão do inóculo em 100 µL de água ultra-pura estéril e posterior homogeneização. Este foi submetido à temperatura de 95° C por 5 minutos e em seguida resfriado em banho de gelo por 10 minutos. Após tal procedimento o material era estocado a - 20 ° C até o preparo das reações.

2.3.2.2 - Preparo da reação e amplificação

Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos específicos para *Listeria monocytogenes*: LIS-R (AAGCAGTTACTCTTATCCT), reverso para todas *Listeria* spp; MONO5-F (GCTAATACCGAATGATAAGA), iniciador para sequência variante B de *L. monocytogenes* (sorotipo 4a) e MONO7-F (GGCTAATACCGAATGATGAA), iniciador para sequência variante A de *L. monocytogenes* (todos os demais sorotipos), conforme descrito por Somer e Kashi (2003).

Foram utilizados para cada reação 2,5 µL de tampão de Taq (10X), 2 µL de MgCl₂ (50 mM); 1 µL de dNTPs (10 mM); 2 µL de LIS-R (20 µM) e 1 µL de cada primer iniciador Mono5-F e Mono7-F (20 µM); 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL); 2 µL de DNA e água mili-q para completar uma reação de 25 µL.

A amplificação foi conduzida em um termociclador, seguindo-se o programa: 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial, seguida por 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu nas etapas de desnaturação (95°C por 40 min.), anelamento (58°C por 40 min.), extensão dos oligonucleotídeos (72°C por 40 min.) e ainda um ciclo final a 72°C por 7 minutos.

Como controle positivo, utilizou-se *L. monocytogenes* CDC F4555 e ATCC 19119, cepas padrão obtidos na Fundação Oswaldo Cruz.

2.3.2.3 - Eletroforese

Em 5 µL do produto da amplificação foram adicionados 3 µL de padrão de corrida, e posteriormente inoculados em gel de agarose a 1,0%, já acrescido de brometo de etídeo na concentração de 10 mg/mL (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 0,5X a 100 volts por 30 minutos e em seguida fotografado sob luz ultra-violeta. A amplificação de um fragmento de 314 pb caracteriza a espécie *L. monocytogenes*.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 230 amostras analisadas, baseado na metodologia da USDA, para identificação e diferenciação de bactérias do gênero *Listeria*, 107 (46,5%) apresentaram comportamento bioquímico característico para *L. innocua* e apenas duas (0,9%) amostras apresentaram comportamento bioquímico característicos para *L. monocytogenes*, totalizando 109 amostras estocadas para posterior confirmação molecular.

Nesta pesquisa, optou-se pela estocagem de tais espécies em razão da similaridade do comportamento bioquímico destas bactérias nas provas de metabolismo dos açúcares e tendo a prova de hemólise em ágar sangue como único diferencial entre as mesmas. Assim, em ágar sangue, *L. monocytogenes* por ser uma espécie beta - hemolítica apresentou um halo de hemólise ao redor da colônia, enquanto *L. innocua* não. No entanto, existem algumas cepas de *L. monocytogenes* que apesar de patogênicas, reduzem ou perdem sua capacidade de causar a beta hemólise em ágar sangue, tornando impossível a distinção entre *L. monocytogenes* não hemolítica de *L. innocua*.

Assim, das 107 amostras identificadas como *L. innocua* pela técnica tradicional, dez, posteriormente, foram identificadas como *L. monocytogenes* pela técnica molecular de PCR, confirmando a incapacidade destas de provocar hemólise. Desta forma, 9,34% das amostras positivas para *L. monocytogenes* seriam erroneamente interpretadas como *L. innocua* caso os resultados fossem baseados exclusivamente pela metodologia tradicional. Resultados semelhantes foram verificados por Chiarini (2007), em pesquisa realizada em abatedouro de aves, no qual verificou um percentual de 23,3% de resultados falsos negativos.

Estes resultados ratificam a importância de uma reavaliação da metodologia oficial estabelecida pelo MAPA, através da Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003) que até o presente não considera o método molecular de PCR e estabelece que somente métodos aprovados por eles possam ser empregados como oficiais.

De um total de 230 amostras analisadas pela técnica tradicional, duas amostras foram armazenadas com comportamento bioquímico característico para *L. monocytogenes* e 107 como suspeitas de contaminação por *L. innocua*, totalizando 109 amostras armazenadas para posterior confirmação molecular (Tabela 3).

Tabela 3 - Pontos contaminados por *L. innocua* e *L. monocytogenes*.

Identificação/ pontos	Pontos de colheita	Total de amostras colhidas	Amostras estocadas	(Li)	(Lm)
P1	Carcaça - Após a sangria	20	00	00	00
P2	Carcaça - Após evisceração	20	09	08	01
P3	Carcaça - Após o chiller	20	07	06	01
P4	Cortes armazenados em câmara fria	20	15	15	00
P5	Mesa inox (sala de evisceração)	10	01	01	00
P6	Água do Chiller	10	04	03	01
P7	Luvas (sala de evisceração)	20	05	05	00
P8	Faca (sala de evisceração)	10	01	01	00
P9	Faca (desossa)	10	07	04	03
P10	Luva (desossa)	10	06	03	03
P11	Mesas (desossa)	20	19	19	00
P12	Ralo (desossa)	10	09	08	01
P13	Bandeja p/ armazenamento prod. câmara fria	10	09	09	00
P14	Cortes embalados	40	17	15	02
Total		230	109	97	12

Li = *L. innocua*

Lm = *L. monocytogenes*

P = Pontos

Foram confirmadas por PCR as duas amostras identificadas como *L. monocytogenes* por técnica convencional e 10 das 107 amostras suspeitas de contaminação por *L. innocua*. As 97 amostras restantes foram confirmadas como *L. innocua*, representando 89% das 109 amostras suspeitas estocadas.

O alto nível de contaminação por *L. innocua* também foi verificado por Pinho et al. (2006), ao investigar a diversidade do gênero *Listeria* em amostras de superfície, em diferentes setores de um abatedouro de aves. De 349 amostras analisadas, 70 amostras (20,06%) apresentaram contaminação para *Listeria* spp. Destas, 66,07% foram identificadas como *L. innocua*; 17,86% *L. monocytogenes*; 15,18% *L. welshimeri* e 0,89% como *L. grayi murray*. Assim, *L. innocua* foi a espécie mais freqüente do gênero em todos os setores da indústria, indicando que possíveis relações de antagonismo dentro do gênero podem ter ocorrido, uma vez que a freqüência desta espécie cresce, a diversidade das demais espécies diminui.

Verificou-se que houve maior contaminação de facas, luvas e mesas do setor de desossa, quando comparado com os mesmos itens do setor de evisceração. Este fato pode estar relacionado à capacidade de *Listeria* spp sobreviver em ambiente de refrigeração, assim o ambiente climatizado da sala de desossa exerce efeito negativo sobre os demais microrganismos, favorecendo então a proliferação de listeria neste ambiente.

Este dado pode ser interpretado de diferentes maneiras, como a possibilidade desta bactéria estar presente na planta processadora, por meio de biofilmes formados em equipamentos e ou utensílios, causando contaminação cruzada durante as etapas de abate e acondicionamento do produto final. Tompkin (2002) afirmou que as células agrupadas em biofilmes são mais resistentes ao processo de higienização e também tem grande potencial de se libertar, fazendo deste local uma fonte contínua de contaminação.

Tal resultado também pode ser relacionado ao número restrito de funcionários deste estabelecimento que, desempenhando mais de uma função em diferentes setores do abatedouro, podem carrear a contaminação de um

setor para outro, uma vez que *L. innocua*, segundo Pinho et al. (2006), é mais frequente em contaminação ambiental que *L. monocytogenes*.

As diferentes pesquisas realizadas em plantas frigoríficas de aves demonstram que o maior percentual de isolamento de *L. monocytogenes* encontra-se na área limpa e principalmente refrigerada do abatedouro (RORVICK et al., 2003; CHIARINI, 2007). Esta constatação tem sua importância elevada quando realizamos uma análise do quadro geral. A característica de baixa competitividade deste patógeno frente a outros contaminantes ambientais associados a sua habilidade de crescimento em temperatura de refrigeração, cria um impasse, uma vez que a constante busca do controle de qualidade de uma empresa para implantação e validação dos programas de qualidade (HACCP, PPHO, GMP, além dos ISOs) assegura um ambiente favorável à contaminação por *L. monocytogenes*.

Com relação às amostras obtidas das luvas dos manipuladores de alimentos, verificou-se a presença de *L. monocytogenes* em 10% (3/30) de amostras de luvas pesquisadas, representando 1,34% (3/230) do total analisado. Resultado semelhante foi verificado por Barbalho et al. (2005), ao analisarem a prevalência deste patógeno em um abatedouro de aves na Bahia. Em tal pesquisa, isolaram *L. monocytogenes* em 4/37 (11,8%) das amostras de luvas e mãos dos manipuladores. Ainda, em concordância com a pesquisa supra citada, Chiarini (2007), identificou a presença deste patógeno em 13,2% das amostras de luvas e mãos de manipuladores.

Não foi verificada a presença de *L. monocytogenes* nas amostras de facas do setor de evisceração, no entanto, verificou-se a presença do referido patógeno em 30% (3/10) das facas do setor de desossa. A identificação deste microrganismo nas facas apenas do setor de desossa pode estar relacionado com a tolerância à temperatura de refrigeração do mesmo. Outro fator que pode ter contribuído para a não detecção de *L. monocytogenes* nas facas e luvas do setor de evisceração, refere-se à presença de outros patógenos autóctones no intestino das aves.

Em 10 (100%) das amostras de água do *chiller* examinadas, quatro (40%) foram estocadas como suspeitas para *L. innocua*, destas, três (30%)

foram confirmadas por PCR como *L. innocua* e uma amostra foi identificada como *L. monocytogenes*. Assim, apenas 10% (1/10) das amostras de água do *chiller* foram identificadas a presença de *L. monocytogenes*. Este resultado encontra-se em conformidade com os resultados encontrados por Barbalho et al. (2005), os quais verificaram a ausência de *L. monocytogenes* em todas as amostras de água do *chiller* analisadas.

Entre as amostras colhidas do ralo da sala de desossa, apenas uma, representando 10% do total destas, foi confirmada como *L. monocytogenes* através de técnica molecular. Entretanto, Rodrigues et al. (2002), identificaram a presença de *L. monocytogenes* em 100% das amostras de drenos e pisos de uma linha de processamento de *nuggets* congelados de frango. A diferença entre tais resultados podem estar relacionados à quantidade de funcionários do setor, ao volume de processamento de cada indústria entre outros fatores.

Do total de 60 amostras de cortes de frango analisados (P4 + P14), 32 amostras (53,33%) foram armazenadas de acordo com o comportamento bioquímico, como suspeitas para *L. innocua*. Destas, 30 amostras (50%) foram confirmadas por PCR como *L. innocua* e duas amostras (3,33%) foram identificadas como *L. monocytogenes*.

Foram consideradas as amostras do produto final como positivas para *L. monocytogenes*, apenas aquelas que após isolamento por metodologia tradicional foram confirmadas por PCR com amplificação de um fragmento de 314 pb. Assim, identificou-se a presença do referido patógeno em duas amostras do produto final, representando 3,33% do total de cortes pesquisados. As amostras positivas para *L. monocytogenes* estão apresentadas na Figura 4.

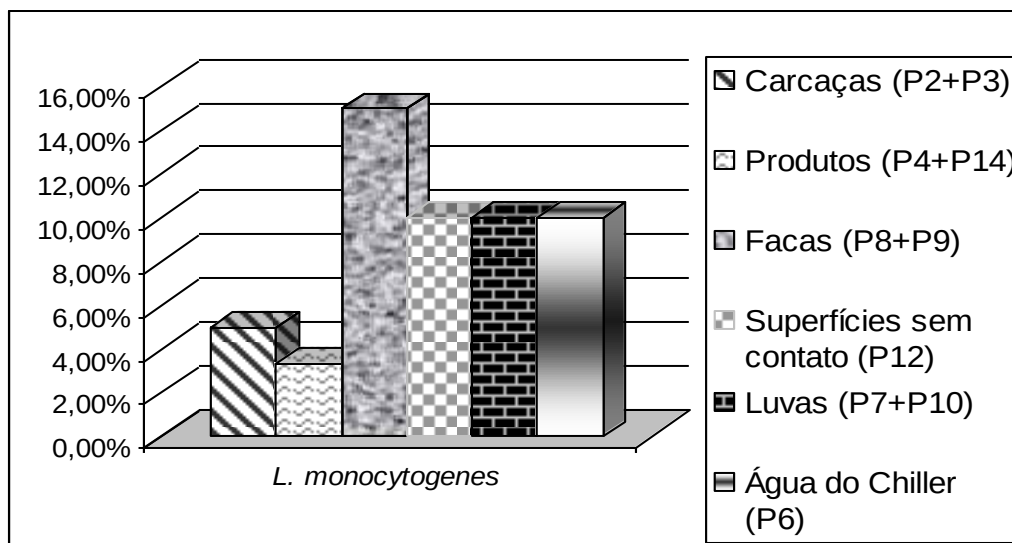


Figura 4 - Distribuição das amostras positivas para *L. monocytogenes* nos seis grupos de amostras colhidas.

A detecção de *L. monocytogenes* no produto final deve ser analisada sob dois aspectos. Apesar de este microrganismo ter sido detectado nos cortes já embalados, este resultado não indica um risco direto à saúde do consumidor, uma vez que o produto passará por tratamento térmico antes do consumo. Por outro lado, o mesmo servirá de fonte de contaminação, favorecendo a disseminação do patógeno para o ambiente de preparo e armazenamento do alimento. Além de favorecer a contaminação cruzada por meio de manipuladores, equipamentos e utensílios que entrem em contato com o mesmo.

Ao analisarmos os resultados verificados em diferentes pesquisas em abatedouro de aves, observamos que não há um nível de contaminação a ser esperado, em virtude da discrepância dos resultados verificados. Chiarini (2007) em sua pesquisa relatou que a contaminação do produto final por *L. monocytogenes* em um abatedouro com evisceração automática foi de 14,4% (13/90) amostras, enquanto que em um abatedouro com evisceração manual foi de 19,4% (18/93) amostras. Autores como Lage (1993); Kabuki (1997) e Pelisser et al. (2001), relataram contaminação do produto final na proporção que variam de 4,4% a 60%. Desta forma, torna-se extremamente difícil

comparar tais resultados e explicar a razão do nível de contaminação por *L. monocytogenes* neste abatedouro ter sido superior ou inferior a aquele.

Assim, os resultados encontrados na presente pesquisa e os diferentes resultados verificados na literatura científica devem ser correlacionados com cautela uma vez que devemos considerar variáveis como volume de abate do estabelecimento amostrado, os procedimentos operacionais padrões, os planos de controle de qualidade aplicados em cada, assim como a metodologia utilizada para identificação do microrganismo em cada pesquisa.

De um total de 230 amostras analisadas nesta pesquisa, associando os resultados encontrados na técnica convencional e na molecular, foram confirmadas a presença de *L. monocytogenes* em 12 (5,21%) do total de amostras analisadas. Estes resultados são facilmente visualizados na Figura 5.

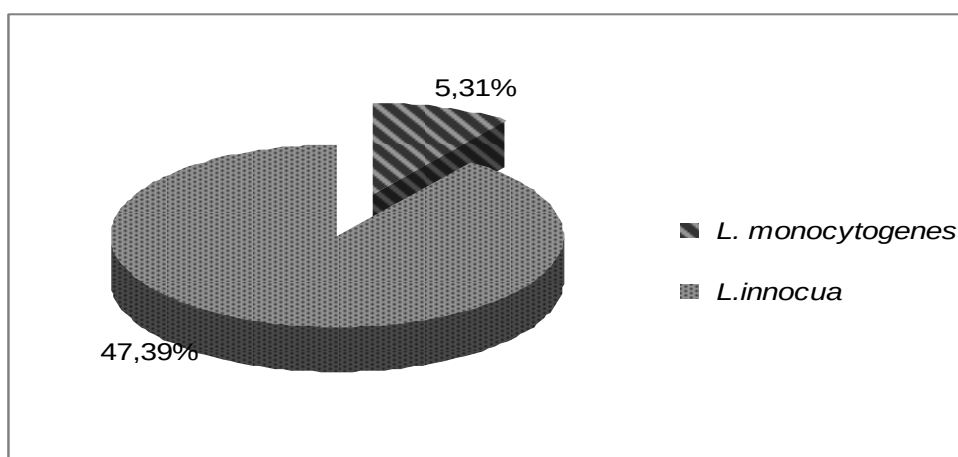


Figura 5 - Amostras positivas para *L. monocytogenes* e para *L. innocua*.

Resultados relativamente próximos foram verificados por Colvara et al. (2008), ao pesquisar a prevalência de *L. monocytogenes* na cadeia produtiva de frangos no sul do Brasil. Em 128 amostras provenientes do abatedouro, estes autores observaram que 11,7% das amostras (15/128), apresentavam contaminação por *L. monocytogenes*. O nível de contaminação por *L. monocytogenes* verificado nesta pesquisa encontra-se abaixo da média dos verificados em outras pesquisas similares, no entanto, os resultados verificados para *L. innocua* encontram-se dentro da média.

Em pesquisa realizada em abatedouro de aves Chiarini (2007), identificou a presença de *L. monocytogenes* em 16,4% das amostras e 58,4% para *L. innocua*.

Outro fator que merece destaque constatado nesta pesquisa refere-se ao índice de contaminação por *L. innocua* na planta processadora e no produto final. Apesar desta espécie não apresentar perigo em saúde pública, por não ser patogênica ao homem, o elevado nível de contaminação deve ser encarado como um indicativo de falhas no fluxograma de abate, permitindo a entrada e perpetuação de *L. innocua*, aumentando assim o risco de contaminação por *L. monocytogenes*.

Yokoyama et al. (2005), relacionam à freqüente ocorrência de *L. innocua* em alimentos como indicativo da presença de *L. monocytogenes*.

Petran e Swanson (1993) verificaram que os caldos de enriquecimento comumente utilizados para identificação de *Listeria* em alimentos favorecem o crescimento de *L. innocua* em relação a *L. monocytogenes*. Estes autores relataram que ao inocularem proporções iguais de *L. innocua* e *L. monocytogenes* nos caldos de enriquecimento TSB-YE, FRASER e UVM, o tempo de geração de *L. innocua* foi menor que de *L. monocytogenes* apresentando uma população de *L. innocua* superior. Neste contexto, estes autores afirmam que a real incidência de *L. monocytogenes* talvez não seja normalmente registrada, uma vez que os meios de enriquecimento usados no isolamento de *L. monocytogenes* favorecem a multiplicação de *L. innocua*.

Yokoyama et al. (2005), em pesquisa avaliando o tempo de geração de *L. innocua* e de *L. monocytogenes* em alimentos, verificaram que *L. innocua* produziu bacteriocinas, responsáveis pela inibição da fase de crescimento exponencial de *L. monocytogenes*.

As facas do setor de desossa assim como as luvas dos manipuladores, apresentaram o maior percentual de contaminação por *L. monocytogenes*, quando comparado com as demais amostras positivas nesta pesquisa. Desta forma, deve-se considerar a importância das mesmas, como fonte de disseminação do patógeno para todos os setores da indústria.

4 – CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que:

- O abate de frangos alternativos não favoreceu a disseminação de *L. monocytogenes* no ambiente de abate e no produto final.
- Constatou-se um baixo nível de contaminação por *L. monocytogenes* das amostras de superfície de contato e não contato no abatedouro.
- As facas e as luvas dos manipuladores do setor de desossa podem ter contribuído na contaminação do produto final, conferindo risco de colonização do ambiente e perpetuação do patógeno por meio de biofilmes.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ARAGON, L. C., et al. Detection of *Listeria* sp. in VIP for *Listeria* immunoassays and a cultural procedure. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2003.

BARBALHO, T. C. F., et al. Prevalence of *Listeria* spp., at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, v. 16, p. 211-216, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 14-51, 19 set. 2003.

CHIARINI, E. ***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação.** 2007. 149 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

COLVARA, J. G.; et al. Prevalência de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de frangos no sul do Brasil. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA.; X ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO, 10., 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas: 2008. Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/ca>>. Acesso em: 19 jan. 2009.

DYKES, G. A.; MOORHEAD, S. M. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 161-166, 2000.

FRANCO, B. D. G. H.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

GONÇALVES, P. M. R. **Isolamento e identificação de *Listeria* spp a partir de amostras de cortes de peito de frango comercializados: avaliação e fatores interferentes.** 1998. 111 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1998.

GONÇALVES, A. C., et al. Ocorrência de *Listeria spp.* em peitos de frango e controle da contaminação através de desinfetantes comerciais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 4., 2001, Campinas. **Anais...** Campinas, 2001.

JANZTEN, M. M., et al. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real time PCR. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 235-247, 2006.

JOHANSSON, J., et al. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. **Cell**, v. 110, p. 551-561, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00928674>>. Acesso em: 22 out. 2008.

KABUKI, D. Y. **Contagem de *Listeria spp* pelo método do número mais provável (NMP), avaliação de sua ocorrência em carnes de frango e da eficiência de sanitizantes na redução da contaminação por *Listeria monocytogenes***. 1997. 91 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

LAGE, M. E. **Ocorrência de *Listeria spp* em carne de frango no mercado da cidade de Belo Horizonte, MG**. 1993. 78 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

MENDES, S. D. C. **Deteção de *Listeria spp.* em frango resfriado pelo método convencional em condições de aerobiose e microaerofilia**. 2000. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

NUNES, I. A. **Bactérias do gênero *Listeria* em carcaças e cortes comerciais de frango obtidos no varejo, avaliação da eficiência dos meios para isolamento e variantes da técnica**. 1994. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.

PAGOTTO, F., et al. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: HEALTH CANADA. Food & Nutrition. Research Programs & Analytical Methods. **Compendium of analytical methods**. *Listeria spp.* and *L. monocytogenes*. Canadá, 2006, v. 3. Disponível em:

<<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio.html>>. Acesso em: 14 jan. 2008.

PELISSER, M. R., et al. Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using clearview and a modified conventional culture method. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 113-116, 2001.

PERRY, C. M.; DONNELLY, C. W. Incidence of *Listeria monocytogenes* in silage and its subsequent control by specific and nonspecific antagonism. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 8, p. 642-647, 1990.

PETRAN, R. L.; SWANSON, K. M. J. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**, v.56, p.616-618, 1993.

PINHO, M. A.; et al. Diversidade do gênero *Listeria* em uma planta de abate e industrialização de aves. **Revista Biotemas**, v. 19, p. 7-12, 2006.

RODRIGUES, D.; et al. Evaluation of two methods for the detection of *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* in a chicken nugget processing plant. **Canadian Journal Microbiology**, v. 48, p. 275-278, 2002.

RORVIK, L. M., et al. Molecular epidemiology survey of *L. monocytogenes* in broils and poultry products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 633-640, 2003.

RYSER, E.T.; MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis, and food safety**. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, 1999. 738 p.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. Londres: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1448 p.

SOMER, L.; KASHI, Y. A PCR method based on 16S rRNA sequence for simultaneous detection of genus *Listeria* and species *Listeria monocytogenes* in food products. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 9, p. 1658-1665, 2003.

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environmental. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 709-725, 2002.

UNITED STATES. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Microbiology Laboratory Guidebook. **Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from meat, poultry, egg and environmental samples**. 5 ed. rev. 2008.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. *Listeria monocytogenes*. **Foodborne pathogens**: an illustrated text. Londres: Marison, 1996. chap. 16, p. 327-345.

YOKOYAMA, E., et al. Influence of bacteriocin-like substance, generation times, and genetic profiles of *Listeria innocua* on the isolation of *Listeria monocytogenes*. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, p. 177-186, 2005.

CAPÍTULO 3

**CEPAS NÃO HEMOLÍTICAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*
ISOLADAS EM AMBIENTE DE ABATE DE FRANGOS
ALTERNATIVOS**

CEPAS NÃO HEMOLÍTICAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLADAS EM AMBIENTE DE ABATE DE FRANGOS ALTERNATIVOS

Cleise de Oliveira SIGARINI^{2*}; Roberto de Oliveira ROÇA³; José Paes de Almeida NOGUEIRA PINTO⁴; Ricardo Ichiro SAKATE⁵; Givago Farias da SILVA⁶; Valéria DUTRA⁷; Luciano NAKAZATO⁷

RESUMO

Cento e sete amostras oriundas de um abatedouro de aves de criação alternativa foram identificadas como pertencentes a espécie *Listeria innocua*, por meio de metodologia tradicional, estas, posteriormente foram submetidas ao ensaio de reação da cadeia da polimerase – PCR com o objetivo de verificar a sensibilidade da técnica tradicional. Dez amostras (10/107) foram identificadas como *Listeria monocytogenes* por metodologia molecular, representando 9,35% de amostras falsas negativas identificadas nesta pesquisa. Em tais amostras foram identificadas amplificações na região de 730 pb, indicando a presença do gene de patogenicidade hlyA, característico nas cepas patogênicas de *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: PCR, beta hemólise, *L. monocytogenes*, gene hlyA.

¹ Recebido em

^{2*} Doutoranda do Programa de Pós-Graduação - UNESP, Botucatu. SP. Brasil. E-mail: cleisesigarini@ibest.com.br

³ Prof. Adj. do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial da FCA - UNESP, Caixa Postal, 237. CEP 18.603-970. Botucatu. SP. Brasil. Pesquisador do CNPQ. E-mail: robertoroca@fca.unesp.br

⁴ Prof. Ass. Dr. do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - UNESP, Caixa Postal 572. CEP 18.618-000. Botucatu. SP. Brasil.

⁵ Fiscal Federal Agropecuário. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasília – DF.

⁶ Mestrando do Programa de Pós-Graduação -. UFMT, Cuiabá - MT.

⁷ Prof. Adj. Dr. do Departamento de Ciência Animal – UFMT. Cuiabá - MT.

LISTERIA MONOCYTOGENES NON-HEMOLYTIC IN ALTERNATIVE POULTRY SLAUGHTERHOUSE.

Cleise de Oliveira SIGARINI^{2*}; Roberto de Oliveira ROÇA³; José Paes de Almeida NOGUEIRA PINTO⁴, Ricardo Ichiro SAKATE⁵, Givago Farias da SILVA⁶, Valéria DUTRA⁷, Luciano NAKAZATO⁷

SUMMARY

A total of 107 samples from birds raised in the alternative production system were collected in a slaughterhouse and were positive for *L. innocua* when the traditional method was used. The sensitivity of PCR was compared to the sensitivity of the traditional method. A total of 10 out of 107 samples were positive for *Listeria monocytogenes*, which represent 9.35% of false negative results in this study. The 730 pb region was amplified in all suspected samples, showing the presence of the hlyA gene that is typical of *L. monocytogenes* pathogenic strains.

Keywords: PCR, beta hemolytic, *Listeria monocytogenes*.

1 – INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes no organismo humano, comporta-se de maneira diferenciada de outros patógenos de origem alimentar. Após entrar no organismo do indivíduo por via oral, multiplica-se na porção final do intestino e em seguida adere-se à mucosa intestinal promovendo uma fagocitose induzida, utilizando o ápice das vilosidades intestinais como porta de entrada para o sistema circulatório (CAMPOS, 2005). Uma vez na corrente circulatória, o patógeno pode atingir diferentes órgãos e tecidos no corpo humano (FARBER e PETERKIN, 1991). Por ser um microrganismo intracelular facultativo, mantém-se a salvo das barreiras naturais do organismo. Segundo Cabanes et al. (2006), *L. monocytogenes* tem a capacidade de ultrapassar três barreiras: a barreira intestinal, materno-fetal e hematoencefálica. Esta bactéria intracelular facultativa é capaz de invadir e de se multiplicar em células fagocitárias e células não fagocíticas.

Diversas proteínas expressas na membrana de *L. monocytogenes* têm um papel chave na interação com a célula hospedeira e no estabelecimento da infecção. As proteínas presentes na membrana bacteriana podem interagir e ativar cascatas de sinalização celular que promovem rearranjos do citoesqueleto e alteração na estrutura da membrana celular, permitindo a internalização da bactéria (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Dentre os vários fatores de virulência utilizados pela *L. monocytogenes* para sobreviver às defesas do sistema imune do hospedeiro, a listeriolisina O (LLO) exerce um papel de extrema importância. Esta tem como função, facilitar o processo de escape da bactéria do interior do fagossoma, impedindo a atuação dos lisossomos e a destruição do patógeno. Entretanto, a simples presença do gene na bactéria não garante que a mesma seja patogênica. Johansson et al. (2002), identificaram alguns clones de *L. monocytogenes* incapazes de expressar determinados genes de patogenicidade. No entanto, o que determina a expressão ou não destes genes ainda não está bem estabelecido. Sabe-se que fatores como temperatura ambiente (Johansson et al., 2002), disponibilidade de oxigênio ou de nutrientes (Liu et al., 2003),

influenciam negativamente na expressão dos mesmos.

Assim, todos os genes de patogenicidade de *L. monocytogenes* são regulados por um único gene, o fator regulador positivo A, ou prfA e codificado pelo primeiro gene de um cluster de genes de virulência (Chakraborty et al., 1992). Este cluster é composto por 6 genes (hly, mpl, actA, plcB, plcA e prfA), conhecido como o *regulon* do gene prfA (Portnoy et al., 1992). Cada gene tem um papel importante a desempenhar para que *L. monocytogenes* se estabeleça no organismo, porém nesta pesquisa abordaremos apenas o papel do gene hlyA e as consequências da ausência ou inexpressibilidade do mesmo.

Segundo Vázquez-Boland et al. (2001), as cepas virulentas de *L. monocytogenes* se caracterizam por produzir a listeriolisina O (LLO), uma toxina que confere o fenótipo hemolítico às colônias de *L. monocytogenes*. Desta forma, o gene hlyA, quando transcrito de forma monocistrônica, é responsável pela codificação da LLO.

No entanto, algumas cepas de *L. monocytogenes* podem perder a capacidade de causar hemólise em ágar sangue, por deleção do gene de patogenicidade hlyA, responsável pela codificação da LLO ou pela incapacidade de expressar este gene no ambiente cultivado. Em síntese, a ausência ou a incapacidade de expressão da listeriolisina, diminui a patogenicidade destas cepas, uma vez que está é responsável pelo escape da bactéria do fagossoma (Figura 1).

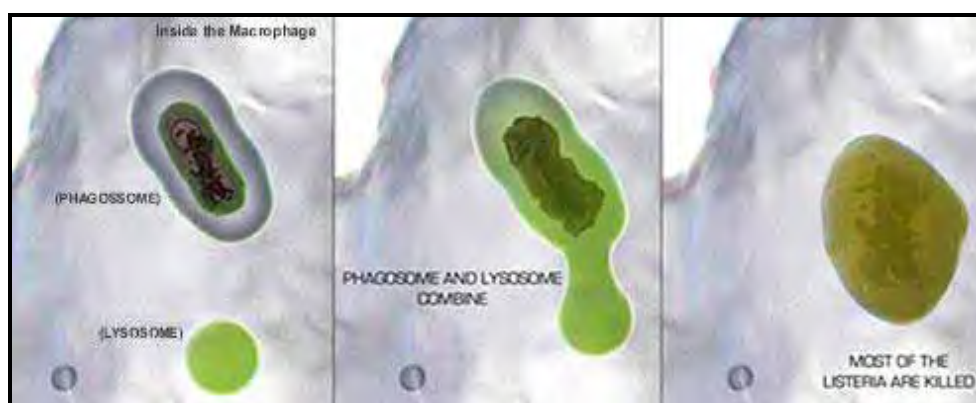


Figura 1 - Mecanismo de escape de *L. monocytogenes* do vacúolo sem auxílio de LLO (fonte: Advaxis, 2007).

Segundo Churchill et al. (2006), uma das melhores técnicas atuais para identificar *L. monocytogenes* patogênicas refere-se à identificação do fator de virulência LLO, expresso apenas nas cepas patogênicas.

Sendo assim, a presente pesquisa foi conduzida com dois objetivos distintos. Inicialmente, verificar se as amostras identificadas como *L. innocua* pela técnica tradicional, seriam confirmadas pela técnica molecular de reação da cadeia de polimerase - PCR, ou se estas na verdade, seriam cepas não hemolíticas de *L. monocytogenes*. Em se comprovando a última hipótese, verificar a ausência ou a não expressão do gene de virulência hlyA nas cepas estocadas, sendo este o segundo objetivo desta pesquisa.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Um total de 230 amostras foram colhidas em um abatedouro no Estado de São Paulo, destinado exclusivamente ao abate de frangos alternativos, sob o regime de fiscalização federal.

Foram realizadas dez visitas ao referido estabelecimento, sendo em cada uma destas, colhidas 23 amostras, em 14 diferentes pontos, perfazendo um total de 230 amostras (Tabela 1).

Todas as amostras com perfil bioquímico característico para *L. monocytogenes* e *L. innocua* foram estocadas e posteriormente submetidas à técnica molecular de PCR, uma vez que a única diferença entre estas espécies encontra-se na capacidade, de apenas a primeira causar beta hemólise em ágar sangue de carneiro e ou eqüino.

Tabela 1 - Identificação dos pontos de colheita de amostras e suas respectivas proporções

Identificação/ pontos	Pontos de colheita	Identificação / amostras	Amostras colhidas/ visita	Total de amostras colhidas
P1	Carcaça - Após a sangria	A1 e A2	02	20
P2	Carcaça - Após evisceração	A3 e A4	02	20
P3	Carcaça - Após o <i>chiller</i>	A5 e A6	02	20
P4	Cortes armazenados em câmara fria	A7 e A8	02	20
P5	Mesa inox (sala de evisceração)	A9	01	10
P6	Água do Chiller	A10	01	10
P7	Luvas (sala de evisceração)	A11 e A12	02	20
P8	Faca (sala de evisceração)	A13	01	10
P9	Faca (desossa)	A14	01	10
P10	Luva (desossa)	A15	01	10
P11	Mesas (desossa)	A16 e A17	02	20
P12	Ralo (desossa)	A18	01	10
P13	Bandeja p/ armaz. Prod. câmara fria	A19	01	10
P14	Cortes embalados	A20; A21; A22 e A23	04	40
Total			23	230

P = Pontos
A = Amostra

2.2 – MATERIAL

De um total de 230 amostras colhidas em diferentes etapas do fluxograma de abate de frangos alternativos, 107 foram identificadas a presença de *L. innocua*.

As amostras foram classificadas como *L. innocua* de acordo com o

comportamento bacteriano nas provas bioquímicas de fermentação dos carboidratos dextrose, ramnose, xilose e manitol, atividade beta hemolítica em ágar sangue de equino e seu comportamento em ágar motilidade.

O gênero *Listeria* apresenta motilidade e desenvolve uma zona de migração típica, espalhando-se na parte mais superficial do meio em virtude de sua característica microaerófila e mantendo-se restrito ao local da picada no tubo de ensaio, assemelhando-se a conformação de um guarda chuva.

Segundo Pagotto et al. (2006), são classificadas como *L. innocua* quando apresentam reação positiva na prova de fermentação dos carboidratos dextrose e ramnose, caracterizada pela viragem do indicador de pH púrpura de bromocresol em meio ácido de púrpura para amarelo e pela ausência de reação na prova dos carboidratos xilose e manitol.

Assim, para cada amostra positiva de *L. innocua* foram colhidas três a cinco colônias isoladas. Estas, foram ressuspensas em caldo tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) e incubadas a 35°C por 24 horas, totalizando 537 sub-amostras.

As amostras foram submetidas à pesquisa molecular para confirmação da sensibilidade da metodologia de isolamento aplicada, de acordo com o protocolo estabelecido por Buenaventura et al. (2006), com adaptações.

2.3 - MÉTODOS

2.3.1 - Extração do DNA bacteriano.

Após prévio período de descongelamento, procedeu-se a homogeneização vigorosa de cada sub-amostra, e obtenção de uma alíquota de 500 µL de cada. Estas foram centrifugadas a 100 rpm por cinco minutos, com o objetivo de separar as células bacterianas do caldo de estocagem. Após descarte do sobrenadante e extração máxima do caldo de estocagem, adicionou-se ao pool celular restante 100 µL de água ultra-pura estéril, seguido de homogeneização intensa para posterior extração do DNA. Adotou-se a metodologia de lise térmica descrita por Sambrook e Russel (2001), na qual o

inóculo ressuspenso em 100 µL de água ultra-pura estéril foi submetido à temperatura de 95° C por 5 minutos e em seguida resfriado em banho de gelo por 10 minutos. Após tal procedimento o material era estocado a - 20 ° C até a amplificação do PCR.

2.3.2 - Preparo da reação e amplificação.

Assim, para cada reação foram utilizados 2,5 µL de tampão de Taq (10x); 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM); 2,00 µL de dNTP mix (10 mM); 1,50 µL do primer HLY-A (20 µM) e 1,50 µL do primer HLY-B (20 µM); 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL); 2,00 µL de DNA e água ultra-pura para completar uma reação de 25 µL.

A seqüência dos oligonucleotídeos específicos para o gene hlyA de *L. monocytogenes* utilizados nesta pesquisa encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na identificação de *L. monocytogenes* pela seqüência do 16S rRNA e gene da listeriolisina - hlyA (BUENAVENTURA et al., 2006)

Oligonucleotídeos por nome	Seqüência dos oligonucleotídeos (5'- 3')
LIS-R	AAGCAGTTACTCTTATCCT
MONO5-F	GCTAATACCGAATGATAAGA
MONO7-F	GGCTAATACCGAATGATGAA
HLYA-A	CATTAGTGGAAAGATGGAATG
HLYA-B	GTATCCTCCAGAGTGATCGA

Para identificação de *L. monocytogenes* foram utilizados os primers: LIS-R; MONO5-F e MONO7-F com amplificação na região de 314 pb. E para identificação do gene da listeriolisina – hlyA, responsável pela capacidade hemolítica de *L. monocytogenes*, foram utilizados os primers HLYA-A e HLYA-B, com amplificação na região de 730 pb.

A amplificação foi conduzida em um termociclador, seguindo-se o programa: 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial, seguida por 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu nas etapas de desnaturação (95°C por 40

min.), anelamento (58°C por 40 min.), extensão dos oligonucleotídeos (72°C por 40 min.) e ainda um ciclo final a 72°C por 7 minutos.

Nesta pesquisa optou-se pela adaptação da técnica de multiplex descrita por Buenaventura et al. (2006), pela utilização de monoplex para cada seqüência de primers anteriormente descritos.

Como controle positivo, foram utilizadas cepas padrão de *L. monocytogenes* CDCF 4555 e ATCC 19119 obtidos na Fundação Oswaldo Cruz e como controle negativo, utilizou-se 2 µL de água ultra pura estéril.

2.3.3 - Eletroforese

Em uma alíquota do produto da amplificação foram adicionados 3 µL de tampão de corrida, e posteriormente inoculados em gel de agarose a 1,5%, já acrescido de brometo de etídeo (0,2 µg/mL) (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 0,5X a 100 volts por 30 minutos e em seguida fotografado sob luz ultravioleta

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Assim, 107 amostras suspeitas para *L. innocua* por meio de técnica tradicional geraram 537 sub-amostras, as quais foram armazenadas a -70°C para posterior confirmação por técnica molecular.

Todas as sub-amostras foram submetidas ao ensaio de PCR, de acordo com o protocolo estabelecido por Buenaventura et al. (2006), com adaptações. As amostras que apresentaram amplificação do fragmento na região de 314 pb caracterizou a espécie *L. monocytogenes* (Figura 2).

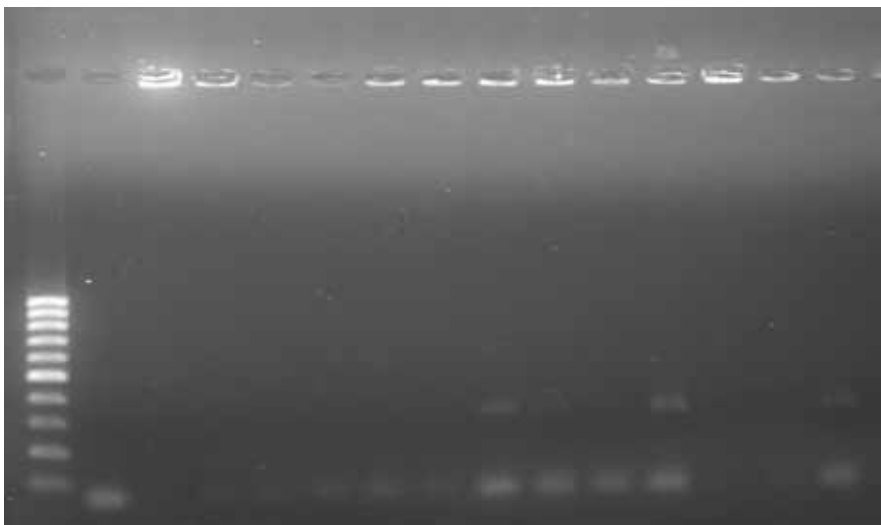


Figura 2 - Amplificação caracterizando a espécie *L. monocytogenes*. Linha 1, marcador de peso molecular (DNA ladder); linha 2, controle negativo; linhas 3 a 8, 10, 11, 13 e 14 amostras caracterizadas como *L. innocua*; Linhas 9, 12 e 15, amostras positivas para *L. monocytogenes* com presença de bandas de 314 pb.

Assim, de 537 sub-amostras armazenadas, 17 foram identificadas como *L. monocytogenes* por meio de técnica molecular de PCR, representando 10 amostras do total de 107 suspeitas (Figura 3).

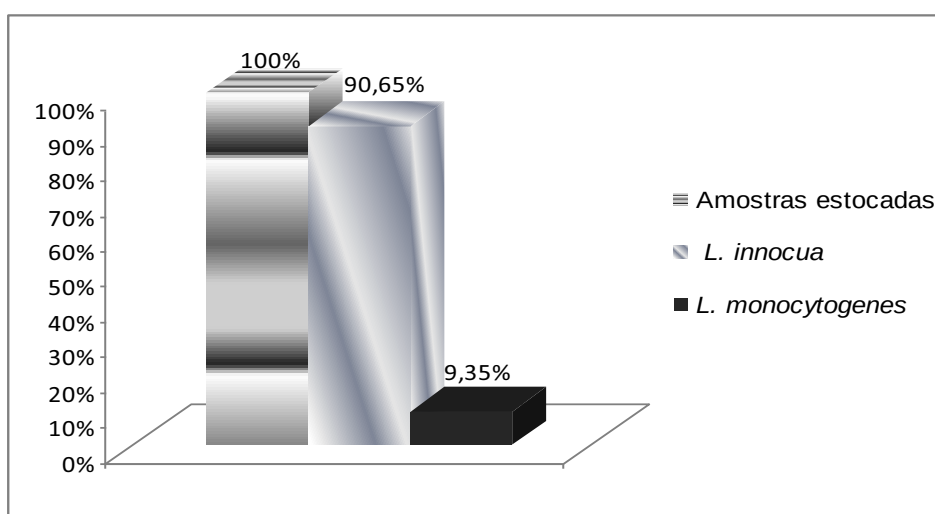


Figura 3 - Distribuição das amostras positivas para *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

Das 17 cepas não hemolíticas identificadas nesta pesquisa, verificou-se em todas a presença do gene *hlyA*, caracterizado pela amplificação na região de 730 pb (Figura 4) demonstrando assim, que as mesmas apenas não expressaram seu potencial virulento.

De acordo com Destro (2006), a exposição de *L. monocytogenes* a situações de estresse sub-letal, como durante o processamento de alimentos ou durante a entrada no organismo hospedeiro, pode afetar sua patogenicidade. Desta forma, cepas patogênicas expostas a essas condições de estresse são mais virulentas que aquelas que não foram. No entanto, quando em ambiente favorável ao desenvolvimento da mesma, utiliza as fontes de carbono convencionais, o que automaticamente leva a inibição da produção do fator PrfA.

Uma vez que a proteína PrfA ativa a transcrição de muitos fatores de virulência de *L. monocytogenes*, sua inativação diminui conseqüentemente a expressão dos fatores de virulência e a patogenicidade deste patógeno. No entanto, de acordo com Liu et al. (2003), quando o ambiente está inóspito, o microrganismo utiliza hexose fosfato como fonte de energia e inicia a expressão dos fatores de virulência.

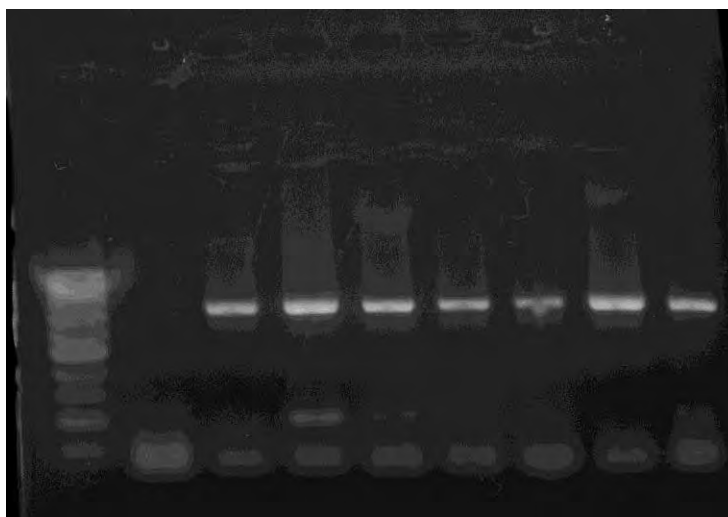


Figura 4 - Presença do gene *hlyA* em cepas de *L. monocytogenes* não hemolíticas. Linha 1, marcador de peso molecular (DNA ladder); linha 2, controle negativo; linha 3, controle positivo e linhas 4 a 9, *L. monocytogenes* com presença de bandas de 730 pb.

Amostras não hemolíticas de *L. monocytogenes* também foram verificadas por Chiarini (2007), em pesquisa realizada em dois abatedouros de aves. Este autor verificou que de 210 cepas de *L. monocytogenes*, 49 apresentaram reação negativa para hemólise, porém todas foram confirmadas por PCR como *L. monocytogenes*.

A incapacidade desta bactéria em provocar hemólise em ágar sangue está diretamente ligada à capacidade patogênica do mesmo. Segundo Portnoy et al. (1992), cepas de *L. monocytogenes* que não apresentam o gene *hlyA* são 10 vezes menos patogênicas que as que apresentam. No entanto, este fato não a torna de menor interesse em saúde pública.

Em complemento, Vázquez-Boland et al. (2001), verificaram que cepas de *L. monocytogenes* não hemolíticas em virtude de uma deleção do gene *hlyA*, ainda eram capazes de escapar do fagossomo, invadir células adjacentes, dando continuidade ao processo infeccioso. Isso se deve à presença de outro fator de virulência, a fosfatidil-inositol fosfolipase C (PI-PLC), também responsável pela lise do vacúolo e escape do patógeno. Apesar de apresentarem um potencial patogênico inferior, quando comparado com as cepas produtoras de LLO, ainda são potencialmente capazes de desencadear um quadro de listeriose.

Diante de todas as questões citadas, a pesquisa convencional de *L. monocytogenes* vem sendo sistematicamente substituída pelas técnicas moleculares, em virtude de sua rapidez, especificidade e reprodutibilidade. No entanto, deve-se considerar que por ser uma técnica altamente sensível, permite a detecção de células não cultiváveis, estressadas ou mortas, levando a um resultado falso positivo no alimento investigado.

Uma variedade de métodos foi desenvolvida para atender as diferentes necessidades para um rápido diagnóstico, porém nenhuma destas técnicas é considerada completa garantindo rapidez, custo baixo, especificidade, sensibilidade suficiente para detectar baixo número de microrganismos e ainda hábeis para identificar apenas as células vivas e principalmente, as patogênicas.

Apesar da busca por uma técnica que satisfaça todos os critérios citados, o objetivo principal deve ser pautado em um programa preventivo eficiente em toda a cadeia do produto alimentício.

4 – CONCLUSÃO

A identificação de cepas não hemolíticas de *L. monocytogenes* na presente pesquisa demonstra a fragilidade da técnica tradicional adotada como parâmetro pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para as indústrias de alimentos.

Este resultado torna-se de extrema importância em saúde pública, uma vez que tais amostras contaminadas por cepas não hemolíticas de *L. monocytogenes* seriam erroneamente consideradas negativas para o referido patógeno. Assim, tal resultado favorece a perpetuação de *L. monocytogenes* no ambiente de abate, servindo de fonte de contaminação para os diferentes setores da indústria e do produto final.

A utilização da técnica molecular é indispensável em uma planta frigorífica, a fim de identificar rapidamente os focos de contaminação durante as etapas de abate, evitando assim a devolução de lotes exportados por resultados falsos negativos, quando estes são baseados exclusivamente por técnica convencional.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVAXIS. The Technology Center of New Jersey. **Why Listeria?**. New Jersey, 2007. Disponível em: <<http://www.advaxis.com>>. Acesso em: 6 out. 2008.

BUENAVENTURA, E ., et al. Simultaneous identification of the genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes* using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) based on the 16S rRNA sequence and the hlyA listeriolysin gene. **Canadian Food Inspection Agency – Laboratory Procedure**. March, 2006.

CABANES, D., et al. Fundação para Ciência e a Tecnologia. Instituto de Biologia Molecular e Celular. **Textos Acadêmicos**. Porto, 2006. Não paginado. Disponível em: <http://www.fct.mctes.pt/projetos/pub/2006/painel_result.html>. Acesso em: 6 out. 2008.

CAMPOS, L. C. *Listeria monocytogenes*. In: TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. 4 ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 29, p. 235 - 242.

CHAKRABORTY, T., et al. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the prfA gene. **Journal Bacteriology**, n. 174, p. 563-574, 1992.

CHIARINI, E. ***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação**. 2007. 149 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CHURCHILL, R. L. T. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. **Journal Microbiological Methods**, v. 64, p. 141-170, 2006.

DESTRO, M. T. ***Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final**. 2006. 81 p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FARBER, J. M.; PETERKIN P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

JOHANSSON, J., et al. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. **Cell**, v. 110, p. 551-561, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00928674>>. Acesso em: 22 out. 2008.

LIU, D., et al. Characterization of virulent and avirulent *L. monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 1065-1070, 2003.

PORTNOY, D. A., et al. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 1263-1267, 1992.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. Londres: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1448 p.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., et al. *Listeria*: pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, p. 584-640, 2001.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

Uma vez que esta é a primeira pesquisa nacional envolvendo a identificação de *L. monocytogenes* em frangos alternativos e em seu ambiente de abate, existe a necessidade de uma investigação mais aprofundada do sistema de criação alternativo, analisando separadamente cada etapa que o diferencia do sistema convencional para que possamos traçar uma correlação dos resultados verificados nesta pesquisa.

Os resultados encontrados nesta pesquisa apontam a realidade exclusiva deste abatedouro de frangos alternativos, demonstrando que neste, há um emprego adequado e eficiente dos planos de controle de qualidade. Entretanto, experimento semelhante deve ser executado em outros abatedouros de frango alternativo para que de posse destes resultados possamos analisar se estes representam a realidade de toda a cadeia do frango alternativo.

Caso esta última hipótese seja comprovada e em complemento às mudanças em todo setor agropecuário visando abolir o uso de quimioterápicos na criação animal, a presente pesquisa ratifica a importância da harmonia entre os elos “criação em sistema intensivo, bem estar animal, produtividade e sanidade do plantel”.