

## DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* COMO SUBSÍDIO À DETERMINAÇÃO DE PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE NO ABATE DE SUÍNOS

### DETECTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* AS SUBSIDY TO THE DETERMINATION OF THE CRITICAL CONTROL POINTS IN THE SWINE SLAUGHTER

Loreane de Ana Guimarães dos SANTOS<sup>1</sup>; Paulo Sérgio de Arruda PINTO<sup>2</sup>; Mauro Pires MORAES<sup>2</sup>; Maria Cristina Dantas VANETTI<sup>3</sup>; Paula Dias BEVILACQUA<sup>2</sup>; Mayara Souza PINTO<sup>4</sup>; Francesca Silva DIAS<sup>5</sup>

**RESUMO:** Foram avaliadas quatro etapas do abate de suíno, quanto à presença de *Listeria monocytogenes*, visando oferecer informações sobre detecção e controle deste agente a serem utilizadas no sistema APPCC. As amostras se constituíram de 120 carcaças suínas. As frequências de *L. monocytogenes* após as etapas de evisceração e de resfriamento foram de 3,3% em ambas, não sendo recuperada após a depilação e imediatamente antes da evisceração. Os resultados não revelaram diferença estatística entre as diferentes etapas de abate. A presença de *L. monocytogenes* nas duas fases caracteriza contaminação, que ocorreu provavelmente a partir de fezes suínas, com possível multiplicação do microrganismo na etapa de refrigeração. Como subsídio ao sistema APPCC, sugere-se um monitoramento nestas duas fases de abate, enquanto PCC (pontos críticos de controle) ou não, com relação à presença de *L. monocytogenes*.

**UNITERMOS:** *Listeria monocytogenes*, Abate de suínos, PCC.

## INTRODUÇÃO

É a *Listeria monocytogenes* uma bactéria que pode ser transmitida ao homem, geralmente pelo consumo de alimentos. Na população humana, este patógeno é potencialmente mais perigoso para os neonatos, prematuros, idosos, gestantes e pacientes imunodeprimidos (ALMEIDA; ALMEIDA; RODRICK, 1999; SCHUCHAT; DEEVER; WENGER, 1992). As principais manifestações clínicas de listeriose são parecidas com um resfriado, acompanhado de febre baixa, mal-estar geral, podendo progredir para uma meningite, meningo-encefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro (LOGUERCIO et al., 2001).

Segundo Chasseignaux et al. (2002), a frequência de *L. monocytogenes* na carne crua, em geral, pode

ultrapassar os 40%, dependendo do tipo de produto. Na França, onde os diferentes surtos de listeriose foram associados com produtos suínos processados; os estudos revelaram que a frequência na carne suína crua está em torno de 16% e que cerca de 68% dos matadouros amostrados apresentaram, em suas superfícies de trabalho, contaminação por *L. monocytogenes*.

A contaminação de carcaças suínas durante o processo de abate pode se dar a partir de fezes contendo *L. monocytogenes* ou a partir de contaminação no próprio ambiente de abate, de superfícies, equipamentos e utensílios contaminados, conforme Borch, Nesbakken e Christensen (1996).

De acordo com Trémoulet et al. (2002), *L. monocytogenes* pode ser isolada de superfícies de equipamentos e utensílios na linha de processamento de

<sup>1</sup> Mestre em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, UFV.

<sup>2</sup> Professor Adjunto, DS, Departamento de Veterinária, IFV.

<sup>3</sup> Professora Titular, DS, Departamento de Microbiologia, UFV.

<sup>4</sup> Bolsista de Iniciação Científica, Departamento de Veterinária, UFV.

<sup>5</sup> Estagiária de Graduação, Departamento de Veterinária, UFV.

Received: 28/05/04 Accept: 06/04/05

alimentos e pode sobreviver nessas superfícies por muitos meses formando biofilmes, uma estratégia de sobrevivência adotada por muitas espécies, incluindo *L. monocytogenes*.

A contaminação da carcaça pode se dar também a partir dos operários da indústria de alimentos, uma vez que estes podem se comportar como portadores sadios de *Salmonella sp*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter sp* e *E. coli* enteropatogênica (KOSARK et al., 1998). O grupo de trabalho em listeriose de origem alimentar da Organização Mundial de Saúde considerou que uma forma fundamental de transmissão da doença ao homem seja através de alimentos contaminados durante sua produção e processamento, podendo se dar por meio das mãos dos manipuladores (DESTRO; SERRANO, 1990).

A *Listeria sp* é uma bactéria que pode ser isolada de carcaças em etapas do abate, na medida que animais doentes ou sadios podem veicular a bactéria principalmente através do intestino (FABER; PETERKIN, 1991). O isolamento da *Listeria sp* realizado em efluentes de matadouros também reforçam esta possibilidade (WATKINS; SLEATH, 1981). Ademais, o congelamento, a desidratação superficial e o resfriamento não parecem afetar a sobrevivência da *Listeria sp* na carne (FABER; PETERKIN, 1991).

A legislação brasileira determina a ausência de *L. monocytogenes* em 25 gramas de queijo, mas para outros alimentos, como produtos cárneos, ainda não existe um limite regulatório (BRASIL, 2001). Dada a frequência de *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos de origem suína, a sua detecção deveria ser levada em consideração na avaliação do risco de transmissão da listeriose para o ser humano a partir de produtos cárneos.

O sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), proposto há cerca de trinta anos, enfoca a segurança dos alimentos da colheita ou produção até o consumo, priorizando a prevenção dos perigos. Princípios importantes explorados no sistema APPCC envolvem a identificação dos perigos microbiológicos e a determinação de pontos críticos nos quais esses perigos podem ocorrer devendo ser minuciosamente controlados.

Por conseguinte se faz necessário na implantação de um plano APPCC, a determinação de limites críticos para o perigo previamente identificado e a escolha de respectivos procedimentos de monitoramento e verificação, como a análise microbiológica, visando o estabelecimento de ações corretivas, quando o processo se desvia do controle.

Num processo de abate de suínos algumas etapas são consideradas como pontos críticos de controle (PCC) para diversos perigos microbiológicos, dentre eles *L.*

*monocytogenes*. A avaliação da carne suína investigando *L. monocytogenes* no processo de abate tem sido alvo de estudos e revisão tanto na Europa como nos EUA e Canadá (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996). No entanto, trabalhos nacionais que busquem determinar a ocorrência de *L. monocytogenes* em estabelecimentos de abate de suínos ainda são pouco divulgados.

Nesse propósito foi investigada a presença de *Listeria monocytogenes* em carcaças suínas, durante diferentes etapas de abate, visando oferecer informações sobre a detecção e o controle deste agente, a serem utilizadas em sistema de controle de qualidade da carne suína, como o APPCC.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem e delineamento da investigação

As amostras foram coletadas em ambientes de abate num Matadouro-Frigorífico de suínos, localizado em Minas Gerais, fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal.

As amostras foram constituídas, de 120 carcaças de suínos obtidas, aleatoriamente, em diversos dias de coleta. Os esfregaços superficiais de carcaças foram coletados em quatro etapas distintas do processo de abate, sendo coletadas 30 amostras por etapa.

Cada unidade amostral (carcaça) foi composta de sete subamostras coletadas de partes pré-estabelecidas (140cm<sup>2</sup>) de superfícies externa e interna de cada carcaça; nas diferentes etapas do abate: após a depilação (ponto A) e imediatamente antes da evisceração (ponto B); quando selecionaram-se para coleta as superfícies externas dos quatro pernis, dos flancos direito e esquerdo e do ventre na sua região central; após a evisceração (ponto C) e após o resfriamento de 24 a 48 horas (ponto D), foram selecionadas as superfícies interna e externa dos pernis traseiros e a superfície interna da região centro-lateral do ventre de uma das meias-carcaças.

As amostras de carcaças foram analisadas por meio de pesquisa microbiológica de rotina laboratorial para isolamento e identificação de *Listeria sp* e *L. monocytogenes*.

### Análise microbiológica

A determinação da presença de *L. monocytogenes* foi feita segundo adaptação de Silva, Junqueira e Silveira (1997), usando a técnica do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

As amostras de carcaças foram homogeneizadas, no dia da coleta, em 140 mL de água peptonada, durante

1 minuto, em homogeneizador peristáltico (Stomacher). Cinquenta mililitros do homogenato foram destinados à pesquisa de *L. monocytogenes*, sendo cada 25 mL utilizados em métodos de enriquecimento seletivo primário distintos.

No enriquecimento seletivo primário 25 mL da amostra, previamente homogeneizada, foram cultivados em 225 mL de Caldo Universidade de Vermont, incubando-se a 30°C por 24 horas. Paralelamente, também foi feita a inoculação de 25 mL em Caldo de Enriquecimento para *Listeria*, para a pesquisa do microrganismo. O enriquecimento seletivo secundário foi feito transferindo-se alíquotas de 0,1 mL do caldo de enriquecimento seletivo primário para tubo com 10 mL de Caldo Fraser, seguindo-se a incubação à 35°C por 24 horas.

A partir dos meios de enriquecimento secundário que apresentaram escurecimento, indicativo de hidrólise da esculina, foi inoculada com alça uma placa de Ágar Oxford Modificado. Em caso de não escurecimento, o caldo Fraser foi incubado novamente e repetiu-se a observação a leitura da hidrólise da esculina após 40 horas de incubação, cultivando-se as amostras positivas. As placas de Ágar Oxford Modificado foram incubadas a

35°C e a observação de colônias típicas foi feita com 24 e 48 horas de incubação. As colônias de *Listeria* no Ágar Oxford Modificado são esféricas e circundadas por halos pretos resultantes de hidrólise da esculina.

Para a confirmação do gênero *Listeria* e identificação da espécie, pelo menos três colônias típicas de cada placa de Ágar Oxford Modificado foram cultivadas em placas de Ágar Trypticaseína e Soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura. Após incubação a 30°C por 24 a 48 horas as colônias foram observadas sob luz oblíqua, num ângulo de 45°, selecionando-se as azuladas típicas. As provas para a identificação constituíram-se de coloração de Gram, catalase, motilidade em ágar sulfeto indol, motilidade à 20-25°C, redução de nitrato, atividade hemolítica, fermentações da dextrose, xilose, ramnose, manitol, maltose, hidrólise da esculina e teste de CAMP.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Listeria* sp e *L. monocytogenes* foram isoladas de amostras coletadas de carcaças após a evisceração e refrigeração (Tabela 1).

**Tabela 1.** Frequência (%) de amostras positivas para *Listeria* sp e *L. monocytogenes* por pontos de coleta (n=30)\*.

Pontos de coleta	<i>Listeria</i> sp N (%)	<i>Listeria monocytogenes</i> N (%)
A	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>b</sup>
B	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>b</sup>
C	2(6,66) <sup>a</sup>	1(3,33) <sup>b</sup>
D	1(3,33) <sup>a</sup>	1(3,33) <sup>b</sup>

A = imediatamente após o escaldamento/depilação.

B = imediatamente antes da evisceração

C = após a evisceração.

D = após 24-48 horas de refrigeração.

\* Resultados de mesma coluna seguidos de uma mesma letra não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de significância de 5%.

Os resultados não apresentaram diferença estatística entre as etapas de abate, quando se analisou *L. monocytogenes* (p = 0,288) ou *Listeria* sp (p = 0,565).

A presença de *Listeria* sp e *L. monocytogenes* nas amostras correspondentes aos pontos C (evisceração) e D (refrigeração) indica que a carcaça pode ser contaminada por fezes de animais portadores, sadios ou doentes, durante o abate ou a partir do próprio ambiente de abate contaminado. Borch, Nesbakken e Christensen (1996) também relataram que *L. monocytogenes* pode

ser isolada de fezes suínas, presente em 2,2% das amostras de suínos não SPF (livre de patógenos específicos), na Dinamarca. Os mesmos autores ressaltaram que *L. monocytogenes* pode ser um problema localizado no matadouro, indicando condições insatisfatórias da higiene do ambiente.

Nos Estados Unidos, o Departamento de Agricultura (USDA) relatou uma frequência de 7,4% de *L. monocytogenes* em amostras de carcaças suínas resfriadas e que o uso das boas práticas de manejo na

fazenda reduz as chances dos animais chegarem ao matadouro com patógenos, incluindo *L. monocytogenes*, que pode ocorrer na microbiota intestinal dos suínos (McMULLEN, 2000). O emprego das Boas Práticas Agrícolas na fazenda auxilia na diminuição das chances dos animais chegarem contaminados ao estabelecimento de abate. Medidas como a utilização de rações livres de patógenos, limpeza e desinfecção dos equipamentos e locais, treinamento e higiene dos funcionários envolvidos contribuem para a redução dos níveis de contaminação dos animais (McMULLEN, 2000).

Como subsídio ao sistema APPCC, sugere-se, com base nos nossos resultados, um melhor monitoramento nas fases C e D do processo de abate, com relação à presença de *L. monocytogenes*, como observado em outros trabalhos (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996; McMULLEN, 2000).

Durante o processamento, a carcaça pode ser recontaminada, e a lavagem com ácidos orgânicos após a evisceração deve ser considerada no plano APPCC com a finalidade de reduzir a carga microbiana. O uso de banhos com ácidos orgânicos e de culturas bioprotetoras diminuem a frequência de *L. monocytogenes* na carne suína e devem ser considerados como medidas importantes no controle deste microrganismo, uma vez que as temperaturas de refrigeração não são suficientes para controlar esta bactéria (McMULLEN, 2000; WILLIAMS; GOLDEN, 2001).

Como a dose mínima infectante de *L. monocytogenes* não é conhecida, mas pode ser inferior

a  $10^3$  UFC (GERMANO & GERMANO, 2003), mais baixa que a maioria das bactérias patogênicas encontradas na carne, a presença deste microrganismo na carne suína em natureza desperta preocupação por parte dos serviços de saúde pública e das indústrias alimentícias. A pesquisa de *L. monocytogenes* em estabelecimentos brasileiros de abate de suínos merece maior atenção das autoridades de Saúde Pública para o bem estar da população e a qualidade microbiológica dos alimentos produzidos neste país.

Considerando a inexistência da investigação nacional de *Listeria* sp no processo de abate de suínos, os resultados desta pesquisa alertam para a demanda de novas investigações dessa natureza e sugerem uma melhor avaliação de riscos quanto à transmissão da listeriose ao ser humano a partir da carne destes animais, dada a grande diversidade de padrões higiênico-sanitários de abate existentes no Brasil.

## CONCLUSÕES

*Listeria monocytogenes* é um perigo microbiológico associado ao consumo da carne de suínos. A pesquisa de *L. monocytogenes* em estabelecimentos durante o processo de abate é importante para a análise dos pontos críticos de controle num plano APPCC.

Há evidência da presença de *L. monocytogenes* e *Listeria* sp após a evisceração e resfriamento das carcaças, resultando de uma provável contaminação, a partir das fezes do animal, com possível multiplicação do microrganismo na etapa de refrigeração.

---

**ABSTRACT:** There were evaluated four stages of the swine slaughter about the *Listeria monocytogenes* presence in the swine carcasses, as subsidy to the APPCC system. The samples were constituted of 120 swine carcass. The frequencies of *L. monocytogenes* after the evisceration and chilling were of 3,3% for both stages, but the bacteria were not isolated after the depilation and immediately before the evisceration. There was not statistical difference among the different slaughter stages. The presence of *L. monocytogenes* in the two mentioned phases characterizes contamination, that can be resulted from swine feces, with possible multiplication of the microrganismo in the stage of refrigeration. As subsidy to the system APPCC, can be suggested, a better evaluation of the two referred slaughter phases, while CCP (critical control points) or not, with relationship to the presence of *L. Monocytogenes*.

**UNITERMS:** *Listeria monocytogenes*, Swine slaughter, CCP.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C.; RODRICK, G. E. *Listeria monocytogenes*: importância e distribuição nos alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 64, p. 19-21, set, 1999.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Harzad identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, St. Louis, MO, USA, n. 30, p. 9-25, june, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC, n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

CHASSEIGNAUX, E.; GÉRAULT, P.; TOQUIN, M-T; SALVAT, G.; COLIN, P.; ERMEL, G. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, n. 210, p. 271-275, may., 2002.

DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M. *Listeria* sp em alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia Alimentar**, Campinas, v. 24, n. 1/2, p. 13-37, jan/jun, 1990.

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

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos. Qualidade das matérias primas. Doenças transmitidas por alimentos. Treinamento de recursos humanos.** 2.ed. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.

KOSARK, N.; DAUBE, G.; GHAFIR, Y.; CHAHED, A.; JOLLY, S; VINDEVOGEL, H. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine belgian abattoirs. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 5, p. 535-541, 1998.

LOGUERCIO, A. P.; SILVA, W. P. da; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M. da, VARGAS, A. C. de. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, jan/fev, 2001.

MCMULLEN, L.M. Intervention strategies to improve the safety of pork. **Advances in Pork Production**, n. 11, p. 165-173, 2000.

SCHUCHAT, A.; DEEVER, K.; WENGER, J. D. Role of foods in sporadic listeriosis. I. case control study of dietary risk factors. **Journal American Medical Association**, v. 267, n. 15, p. 2041-2045, 1992.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela, 1997.

TRÉMOULET, F.; DUCHÉ, O.; NAMANE, A.; MARTINIE, B. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 210, p. 25-31, apr., 2002.

WATKINS, J.; SLEATH, K. P. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge, and river water. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 50, p. 1-9, 1981.

WILLIAMS, R. C.; GOLDEN, D. A. Influence of modified atmospheric storage, lactic acid, and NaCl on survival of sublethally heat-injured *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, St. Louis, MO, USA, v. 64, n. 3, p. 379-386, mar., 2001.