

MONITORAMENTO DE *Listeria monocytogenes* EM FRIGORÍFICOS DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA – PR

Luma Quirino Paini¹, Mario Rene Sibut Mares de Souza²

Resumo

A *Listeria monocytogenes* é um importante patógeno emergente relacionado a alimentos. Essa bactéria se tornou um grande desafio para as indústrias alimentícias assim como para os órgãos de vigilância sanitária, pela sua alta capacidade de se desenvolver em condições adversas. Os surtos por listeriose tem sido associada a diversos alimentos, entre eles a carne de frango. No Brasil a carne de frango é essencial para a economia, e nos últimos anos o consumo dessa proteína tem aumentado bastante. Diversos estudos revelaram a presença de *Listeria monocytogenes* nesse alimento. Neste trabalho foi realizado o monitoramento de espécies de *Listeria* no processamento da carne de frango, em três frigoríficos com vigilância sanitária, na região metropolitana de Curitiba-PR, pois a presença de *Listeria spp.* representa risco à saúde do consumidor, e demonstra a necessidade de controles de qualidade mais eficientes. Para isso analisou-se o frango inteiro, mecanicamente separado (CMS), congelado e o equipamento onde as amostras foram manipuladas. O isolamento e a identificação do gênero foram feitos por metodologia convencional e a distinção das espécies foi verificada por testes bioquímicos específicos: teste de motilidade a 25°C; produção de catalase (peróxido de hidrogênio a 3%); β hemolisina (Ágar Sangue de Coelho a 5%); da fermentação de dextrose, ramnose, xilose e ágar manitol. Isolou-se *Listeria spp.* em 50% de 48 amostras analisadas, nos três estabelecimentos estudados. Dentre as espécies de *Listeria spp.* isoladas a encontrada com maior frequência foi a *L. innocua* em 87,5% das amostras.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. *Listeria innocua*. Carne de frango. Frigoríficos.

Abstract

Listeria monocytogenes is an important emerging pathogen related to food. This bacterium has become a major challenge for the food industry as well as for health surveillance agencies because of its high capacity to develop under adverse conditions. Outbreaks of listeriosis have been associated with several foods, including chicken meat. In Brazil chicken meat is essential for the economy, and in recent years the consumption of this protein has increased greatly. Several studies have revealed the presence of *Listeria monocytogenes* in this food. In this work the monitoring of *Listeria* species in the processing of chicken meat was carried out in three slaughterhouses with sanitary surveillance in the metropolitan region of Curitiba-PR, as the presence of *Listeria spp.* poses a risk to consumer health, and demonstrates the need for more efficient quality controls. For this the whole mechanically separated (CMS), frozen chicken and the equipment where the samples were manipulated were analyzed. Isolation and identification of the genus were done by conventional methodology and the species distinction was verified by specific biochemical tests: motile test at 25°C; catalase production (3% hydrogen peroxide); β hemolysin (5% Rabbit Blood Agar); fermentation of dextrose, rhamnose, xylose and mannitol agar. *Listeria spp.* in 50% of 48 analyzed samples, in the three establishments studied. Among the species of *Listeria spp.* the most frequently found isolates were *L. innocua* in 87.5% of the samples.

Keywords: *Listeria monocytogenes*. *Listeria innocua*. Chicken meat. Fridges.

1 Introdução

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria de origem alimentar, que também pode ser encontrada no ambiente, é considerada uma doença grave devido sua alta taxa de mortalidade

¹ Acadêmica do Curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

² Biólogo, Prof. Mestre da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

cerca de 20% a 30% dos casos (PIERI *et al.*, 2010). Segundo Selby *et al.*, a listeriose ocorre quando um elevado número de *Listeria monocytogenes* é ingerido (> 100 UFC/ g ou mL) ou quando certos antiácidos e/ou compostos contendo cimetidina são utilizados para sanar úlceras do estômago e azia. A listeriose acomete principalmente indivíduos imunossuprimidos podendo gerar consequências como: aborto, problemas neurológicos, sepse e distúrbios gastrointestinais. Adultos imunocompetentes podem ser portadores e apresentarem sintomas de resfriado ou até mesmo desenvolverem problemas gastrointestinais severos. Tem sido associada a diversos alimentos como é o caso do leite cru, leite supostamente pasteurizado, queijo, sorvete, vegetais crus, carne de linguça, frango cozido e cru, carne crua e peixe cru ou defumado (PIERI *et al.*, 2010).

Durante os anos de 1990 e 2004 na Inglaterra e Países de Gales foram relatados mais de 1932 casos de listeriose (GILLESPIE *et al.*, 2007). No Brasil e no mundo dentre as infecções de origem alimentar, a de maior incidência é a salmonelose, em contrapartida a listeriose apresenta alta taxa de mortalidade. Nos últimos anos tem se observado um aumento nas vendas de produtos industrializados, e esses alimentos prontos para consumo tem contribuído para a ocorrência de infecções alimentares, principalmente os que são consumidos sem nenhum tratamento pós-processamento tais como o presunto cozido (FAI AEC *et al.*, 2011). A *L. monocytogenes* é considerado um micro-organismo extremamente resistente por isso a dificuldade em eliminá-lo das indústrias, algumas pesquisa já demonstraram que existem cepas capazes de permanecer no ambiente de processamento por meses ou até mesmo anos, levando assim a contaminações recorrentes em várias etapas da produção do alimento (MARKKULA *et al.*, 2005). Além disso a bactéria já foi encontrada nas mãos de operários mesmo após higienização, confirmando sua persistência no ambiente e sua grande capacidade de transmissão (JOHNSON *et al.*, 2004). Diversos derivados de cárneos tem sido envolvidos em casos de enfermidade, alguns desse casos são surtos por listeriose. Embora as carnes frescas tenham baixas contagens de *L. monocytogenes* a medida em que ocorre o processamento esse grau aumenta para contaminação (SILVA *et al.*, 2004). Portanto tornou-se relevante monitorar a presença de *L. monocytogenes* na carne de frango em três frigoríficos da região metropolitana de Curitiba-PR, a fim de auxiliar no controle da bactéria na linha de processamento e assegurar um alimento de qualidade ao consumidor.

2 Material e Métodos

As amostragens foram coletadas semanais nos meses de outubro e novembro de 2018, sendo utilizadas para a pesquisa: amostras do frango inteiro, mecanicamente separado (CMS), das superfícies onde a amostra foi manipulada e do frango congelado, totalizando 48 amostras. Foi realizada uma coleta em cada estabelecimento comercial, chamados de frigorífico 1, 2 e 3.

Para avaliação da contaminação da superfície e da matéria-orgânica, foram utilizados *swabs* de algodão esterilizados, umedecidos com água salina a 0,85% estéril, sendo

coletados em 3 pontos (15 cm² cada), representando uma superfície total coletada de 45 cm². Imediatamente após a coleta todas as amostras foram colocadas em um enriquecimento primário em caldo Fraser (Laborclin), segundo metodologia proposta por FARBER *et al.* (1994) e FARBER & DARLEY (1995), após foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo, e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Tuiuti do Paraná (UTP).

No laboratório após 48 horas de incubação em caldo Fraser (Laborclin) a 35-37°C, as amostras positivas (turbacão do meio conforme controle positivo) foram inoculadas em Ágar ALOA meio cromogênico e no Ágar Palcam, a fim de se obter colônias típicas do gênero *Listeria*. A confirmação do gênero foi feita através dos seguintes parâmetros: teste de motilidade a 25°C; produção de catalase (peróxido de hidrogênio a 3%); β hemolisina (Ágar Sangue de Coelho a 5%); da fermentação de dextrose, ramnose, xilose e ágar manitol (Tabela 1). Durante todas as etapas para distinção do gênero foi utilizado um padrão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Tabela 1: Características fenotípicas e bioquímicas utilizadas na distinção de *Listeria* spp.

Testes	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>
Motilidade a 25°C	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	
Beta hemolisina	+	+	+	-	-
Dextrose	+	+	+	+	+
Ramnose	+	-	-	V	V
Xilose	-	+	+	-	+
Manitol	-	-	-	-	-
V = Variável + = Positivo - = Negativo					

Adaptado de: SILVA *et al.*, 2004

3 Resultados e Discussão

A carne de frango no Brasil representa uma importante economia, e encontra-se em constante expansão tanto na parte de produção quanto pela exportação. O mercado internacional é extremamente exigente quanto a controles de qualidade, e devido a alta ocorrência de *L. monocytogenes* em carne de frango, diversas pesquisas tem sido realizadas para monitorar a ocorrência dessa bactéria, já que mesmo sendo um patógeno de grande importância a saúde pública o Programa de Redução de Patógenos do Mapa não prevê seu monitoramento (NALÉRIO *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos e na Europa o consumo de produtos industrializados é bem maior, levando a *Listeria* a ser um grande problema, visando minimizar a ocorrência dessa bactéria em 2001 a *Food and Drug Administration* (FDA) e o *United States Department of Agriculture* (USDA) lançaram um plano de ação principalmente em derivados de carne e aves pronto para o consumo, esses

esforços reduziram os surtos em 40% em comparação a anos anteriores (FAI AEC *et al.*, 2011). Apesar de na literatura já ter relatos de casos raros de listeriose causada por espécies que se encontram no ambiente como a: *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*, a única da espécie *listeria* considerada causadora de doença em humanos é a *L. monocytogenes* que é composta pelos seguintes sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4e, 7, sendo os sorotipos 1/2a 1/2b e 4b responsáveis por 90% dos casos. No ambiente este gênero é composto por seis espécies. O fato desta bactéria ser o único patógeno humano se deve a suas características fisiológicas peculiares que são potencializadas em condições de umidade, em temperaturas abaixo de 3°C e a presença de matéria orgânica (MILILO *et al.*, 2012; MORENO *et al.*, 2012). As *listerias* são bastonetes gram-positivos, crescem em temperatura de 1° a 45°C, mas já existem pesquisas demonstrando que ela se desenvolve em até 0°C, além de suportar constantes congelamentos e descongelamentos (MANTILLA *et al.*, 2007). Embora a *L. monocytogenes* seja a única da sua espécie patogênica aos humanos, a presença de *Listeria spp.* pode indicar uma maior probabilidade de ocorrência de *L. monocytogenes*, sendo então um fator de risco se isoladas em alimentos. Todas as espécies de *listeria* apresentam um crescimento e comportamento similar frente a situações de cultivo. A *L. innocua* é a mais prevalente encontrada em alimentos e no ambiente (VOLOKHOV *et al.*, 2007). Os resultados obtidos (Tabela 2) indicam que houve presença de *Listeria spp.* em 50% das 48 amostras analisadas. Dessas foram isoladas *L. innocua* em 83,33% das amostras, 12,5 % de *L. welshimeri* e 4,16% de *L. monocytogenes*. Está pesquisa demonstrou também que as *listerias* estão presentes em todas as etapas de processamento do frango, e em todos os pontos amostrados dos três frigoríficos (Tabela 3) no frango mecanicamente separado (CMS), no frango inteiro, no equipamento e no frango congelado. O fato de encontrarmos *L. innocua* e *L. welshimeri* nas amostras nos revela um resultado importante, pois, embora a principal patogênica dos humanos seja a *L. monocytogenes*, a identificação de outras espécies eleva a probabilidade e nos indica que há uma grande chance de encontrarmos a *L. monocytogenes* no alimento, além de transmitir um dado importante aos estabelecimentos comerciais, que devem adotar novas técnicas de sanitização.

Tabela 2: Ocorrência de *Listeria spp.* em 48 amostras (matéria-orgânica, superfícies onde a amostra foram processada, produto final e amostra congelada) obtidas em 3 frigoríficos da região metropolitana de Curitiba – PR.

Espécies de Listeria	Frigorífico 1	Frigorífico 2	Frigorífico3	Total
<i>L. monocytogenes</i>	1/16	0/16	0/16	1/48
<i>L. innocua</i>	4/16	7/16	9/16	20/48
<i>L. welshimeri</i>	1/16	0/16	2/16	3/48
<i>L. seeligeri</i>	0/16	0/16	0/16	0/48
<i>L. ivanovi</i>	0/16	0/16	0/16	0/48

Tabela 3: Percentual de isolamento de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. welshimeri* em 48 amostras (frango inteiro, frango mecanicamente separado (CMS), frango congelado e equipamento onde o frango foi manipulado). Obtidas de três frigoríficos na região metropolitana de Curitiba, PR.

Amostra	n ¹	<i>L. monocytogenes</i> (%)	<i>L. innocua</i> (%)	<i>L. welshimeri</i> (%)	Porcentagem (%) em cada amostra
Frango Inteiro	3	0%	66,66%	33,33%	12,5% / 100%
CMS	4	0%	100%	0%	16,67% / 100%
Frango Congelado	9	0%	88,88	11,11	37,5% / 100%
Equipamento	8	12,5%	75%	12,5%	33,33% / 100%

CMS = Frango Mecanicamente Separado

n¹ = Número de amostras positivas

O frio causa uma pressão seletiva sobre essa bactéria, estimulando o seu crescimento, assim em amostras de carnes como o frango que pode ficar até 45 dias refrigerada antes do consumo, esperávamos encontrar uma maior taxa de *Listeria spp.* o que foi comprovado com 37,5% de amostras positivas (Tabela 3). Embora a carne de frango sofra tratamento antes do consumo como aquecimento o que irá destruir as *listerias*, sua manipulação em estabelecimentos comerciais e domicílios irão causar contaminações cruzadas em alimentos prontos para o consumo, favorecendo sua disseminação e levando a um risco maior principalmente para crianças, idosos, gestantes e imunossuprimidos. Outro ponto que favorece a persistência das *listerias* na carne de frango é o fato das mesmas não serem destruídas por condimentos e ingredientes, devido o teor utilizado ser insuficiente para detê-las. O teor de sal (NaCl) e de nitrito considerado suficiente para impedir o seu crescimento deve ser superior a 10,5%, o que se torna impossível pois o nível máximo permitido pela legislação em produtos cárneos é de 2 a 3,5% (WELCH, 2007). Na região analisada não há registros de casos de listeriose em humanos, entretanto como demonstramos nesse estudo a *Listeria spp.* esta presente nos alimentos que consumimos, e devido sua alta patogenicidade e sua capacidade de formar biofilmes, a ocorrência desse microorganismo em matéria orgânica e equipamentos nos leva a refletir outros controles e monitoramento da qualidade microbiológica, para que determinados grupos considerados de risco, não sejam afetados.

Conclusão

Verificou-se a presença de *Listeria spp.* no processamento de carne de frango nos frigoríficos analisados, sendo *L. innocua* em 83,33% das amostras, 12,5 % de *L. welshimeri* e 4,16% de *L. monocytogenes*. O microorganismo *listeria* é de grande importância quando nos referimos a transtornos alimentares, sua presença em alimentos representa um grande perigo a saúde dos indivíduos principalmente imunossuprimidos, o não cumprimento de boas práticas de manipulação

no processamento de alimentos pode levar a casos de listeriose. Como demonstrou essa pesquisa devemos intensificar a fiscalização dos produtos quanto ao controle de qualidade, a fim de assegurar a saúde do consumidor.

Referências

- GILLESPIE, I. A.; MCLAUCHLIN, J.; GRANT, K. A.; LITTLE, C. L.; MITHANI, V.; PENMAN, C.; LANE, C.; REGANT, M. Changinh Pattern of Human Listeriosis, England and Wales, 2001-2004. *Emerging Infections Diseases*. V. 12, n.9, 2007.
- FAI, A. E. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; VERDIN, S. E. F.; PINHEIRO, N. M. S.; BRAGA, A. R. C.; STAMFORD, T. L. M. *Salmonella* sp and *Listeria monocytogenes* in fully cooked ham commercialized in supermarkets of Fortaleza (CE, Brasil): Risk factor for public health. *Ciência e Saúde Coletiva e free themes*, 16(2): 627-622, 2011.
- FARBER, J. M.; DALEY, E. Enumeration of *Listeria monocytogenes* in food. GOVERNMENT OF CANADA. Laboratory procedure. Quebec (Canadá): *Polyscience*, Apr. 71, 71-79, 1995.
- JOHNSON, J.; JINNEMAN, K.; STELMA, G.; SMITH, B. G.; LYE, D.; MESSER, J.; ULASZEK, J.; EVSEN, L.; GENDEL, S. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl Env Microbiol* 70, 4256–4266, 2004.
- MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Importance of *Listeriamonocytogenes* on foods from animal origin. *Revista da FZVA*. Uruguaiiana, v.14, n.1, p. 180-192. 2007.
- MARKKULA, A.; AUTIO, T.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-feld gel electrophoresis. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 68, n. 6, p. 1228-1231, 2005.
- MILILLO, S. R.; FRIEDLY, E. C.; SALDIVAR, J. C.; MUTHAIYAN, A.; O'BRYAN, C.; CRANDALL, P. G.; JOHNSON, M. G.; RICKE, S. C. A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Crit Rev Food Sci Nutr* 52, 712–725, 2012.
- MORENO, L. Z.; PAIXAO, R.; GOBBI, D. D.; RAIMUNDO, D. C.; FERREIRA, T. P.; HOFER, E.; MATTE, M. H.; MORENO, A. M. Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. *Res microbiol*. 163, 268–271, 2012.
- NALÉRIO, E. S.; ARAÚJO, M. R.; MENDONÇA, K. S.; BASSANI, M. T.; SILVA, W. P. *Listeriamonocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 29(3): 626-630, jul.-set. 2009.
- PIERI, F. A.; JOSÉ R. M.; GALVÃO, N. N.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S. Atividade antimicrobiana do óleo de copaíba autoclavado e não autoclavado sobre *Listeria monocytogenes*. *Cienc. Rural* vol.40 no.8 Santa Maria Ago. 2010.
- SELBY, T. L.; BERZINS, A.; GERRARD, D. E.; CORVALAN, C. M.; GRANT, A. L.; LINTON, R. H. Microbial heat resistance of *Listeria monocytogenes* and the impacto n ready-to-eat meat quality after post-package pasteurization. *Meat Science*, 74:425-434, 2006.
- SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAÚJO, M. R.; MACEDO, M. R. P.; DUVAL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. *Ciencia Rural*, Santa Maria, v.34, n.3, p.911-916, mai-jun, 2004.
- VOLOKHOV, D. V.; DUPERRIER, S.; NEVEROV, A. A.; GEORGE, J.; BUCHRIESER, C.; HITCHINS, A. D. The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 73, 1928–1939, 2007.
- WELCH, M. D. Actin-based motility and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. In *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*. Edited by E. Goldfine & H. Shen. New York: Springer.85, 197-223, 2007.