XVIII CIC XI ENPOS I MOSTRA CIENTÍFICA
Evoluir sem extinguir: por uma ciência do devir

DISSEMINAÇÃO DE CEPAS DE *Listeria monocytogenes* NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGOS NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL ANALISADA ATRAVÉS DE PFGE

COLVARA, Júlia Goldbeck[1]; MENDONÇA, Karla Sequeira[1]; NALÉRIO, Élen Silveira[1], SILVA; Wladimir Padilha da[1].

[1]Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – DCTA/FAEM, Universidade Federal de Pelotas - Campus Universitário, Caixa Postal 354 · 96010-900 Pelotas, RS.
juliaqa86@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é o agente etiológico da listeriose, uma grave infecção que ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contaminados com o patógeno (GHANDI; CHIKINDAS, 2007). Por ser uma bactéria ubíqua e devido aos surtos associados ao consumo, principalmente, de alimentos processados, tornou-se uma preocupação para a indústria alimentícia (ILSI, 2005).

O conhecimento detalhado sobre a diversidade das cepas de *L. monocytogenes* é importante e, para tanto, diversos métodos têm sido desenvolvidos para diferenciar esse microrganismo em subtipos e grupos clonais, a fim de melhorar o entendimento sobre sua habilidade de causar surtos e doenças em humanos (WIEDMANN, 2002; RAGON et al., 2008).

Nesse contexto, o método genotípico considerado "padrão ouro" para a tipificação de cepas de *L. monocytogenes* é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), uma vez que possui elevada sensibilidade, alto poder discriminatório, padronização e reprodutibilidade (WIEDMANN, 2002), sendo muito utilizada para a caracterização epidemiológica de cepas envolvidas em surtos de listeriose humana. No entanto, a sensibilidade desta técnica depende da enzima de restrição que será utilizada. Para *L. monocytogenes* comumente utilizam-se as endonucleases *Asc*I e *Apa*I, as quais geram entre 10 e 20 fragmentos visíveis, com pesos moleculares distintos, que serão separados por eletroforese, utilizando a PFGE (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001). Todavia, para assegurar que os padrões de PFGE de diferentes géis possam ser comparados com precisão no banco de dados é utilizado um marcador padrão universal: *Salmonella enterica* sorotipo Braenderup, cepa H9812 (HUNTER et al., 2005).

Este trabalho teve como objetivo determinar o perfil genotípico e estudar a disseminação de cepas de *L. monocytogenes* isoladas na cadeia produtiva de frangos da região sul do Rio Grande do Sul, utilizando-se a técnica de PFGE.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionadas 17 cepas de *Listeria monocytogenes* originárias da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos – DCTA/FAEM/UFPel. Destas, nove cepas foram isoladas em carcaças de frangos (provenientes de um frigorífico-abatedouro e do comércio), sete cepas foram isoladas do ambiente de processamento do mesmo frigorífico-abatedouro e uma cepa foi isolada da cloaca de frango em um estabelecimento avícola, cujas aves são abatidas no mesmo abatedouro. A técnica de PFGE seguiu o protocolo preconizado pelo CDC (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001), com adaptações (MENDONÇA, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Disseminação de *L. monocytogenes* no frigorífico abatedouro de frangos

Os resultados obtidos pela PFGE permitiram observar que nesse frigorífico-abatedouro de frangos algumas cepas de *L. monocytogenes* apresentavam o mesmo pulsotipo. As cepas 43 e 45 (sorotipo 1/2b), foram isoladas na 3ª coleta, no piso da sala de evisceração e numa carcaça no *chiller*, e apresentaram o mesmo perfil genotípico (pulsotipo 14Q), sendo, portanto, consideradas idênticas. Da mesma forma as cepas 22, 44, 50 e 51 (sorotipo 1/2b) que foram isoladas do produto final carcaça de frango (4ª coleta), carcaça no pré *chiller* (3ª coleta), esteira de cortes amostrada antes do início do abate (4ª coleta) e esteira de cortes amostrada no final do abate (4ª coleta), respectivamente, que apresentaram pulsotipo 14N.

A cepa 42 (sorotipo 1/2b), isolada do estrado da mesa de transpasse na 2ª coleta apresentou pulsotipo 14P, enquanto a cepa 52, também sorotipo 1/2b, mas isolada no dreno da sala de resfriamento na 3ª coleta, apresentou o pulsotipo 15M. Já as cepas 7 e 8 (sorotipo 4b), isoladas na 1ª coleta a partir da escova da depenadeira e da mesa de separação de miúdos, respectivamente, apresentaram pulsotipos 18S e 20S.

É importante destacar que as coletas realizadas neste frigorífico-abatedouro se estenderam por um período de seis meses, e que cepas com perfil genotípico idêntico (pulsotipo 14N – cepas 22, 44, 50 e 51), foram isoladas continuamente durante todo o período de amostragem, o que demonstra sua persistência nesse ambiente.

A presença de cepas persistentes de *L. monocytogenes* no ambiente desse frigorífico-abatedouro e no produto final, associado ao fato da coleta ter sido realizada antes do início das atividades de abate, porém após os processos de higienização, sugere a possibilidade de contaminação das carcaças de frango a partir do ambiente de processamento. Este fato tem sido descrito por outros pesquisadores, que relatam que a contaminação do produto final, geralmente ocorre durante o processamento, e é resultado da presença de cepas persistentes no ambiente (MIETTINEM et al., 1999; AUTIO et al., 2002; HEIR et al., 2004).

3.2 Diversidade genética de cepas de *L. monocytogenes* em frangos refrigerados comercializados em Pelotas

As cepas 5, 6, 9, 10, 23 e 26 foram isoladas de amostras de frango refrigerado, provenientes do comércio da cidade de Pelotas, oriundas de dois

frigoríficos-abatedouros situados no Estado do Rio Grande do Sul, denominados Marca A e Marca B.

Todas as cepas foram isoladas de produtos da Marca A, com exceção da cepa 5, isolada de produto final da Marca B. Essa cepa (sorotipo 1/2a) apresentou pulsotipo 9L. As cepas 6, 23 e 26, provenientes de uma mesma amostra de frango refrigerado, apresentaram pulsotipos distintos (8J, 14M e 12N, respectivamente), demonstrando a existência de diferentes clones contaminando essa amostra.

As cepas 9 e 10, sorotipo 4e, isoladas a partir de frango refrigerado do comércio, ambas da mesma marca (Marca A), apresentaram os mesmos perfis genotípicos (pulsotipo 7H).

3.3 *L. monocytogenes* em estabelecimento avícola na região sul do Rio Grande do Sul

Foram amostrados 35 aviários localizados na região sul do Rio Grande do sul, onde se isolou uma cepa (cepa 11) a partir da cloaca das aves (NALÉRIO, 2007). Esta cepa pertence ao sorotipo 4e e foi isolada em um estabelecimento avícola cujas aves são abatidas no frigorífico-abatedouro amostrado neste estudo. A cepa 11 apresentou pulsotipo 7H, o mesmo das cepas 9 e 10, isoladas em frangos refrigerados, também comercializados por essa indústria. Esse resultado é bastante interessante, pois demonstra a importância da matéria-prima na introdução de cepas no ambiente dessa indústria, e posterior contaminação do produto final. Apenas essas três cepas pertenciam ao sorotipo 4e e todas foram geneticamente indistinguíveis.

4. CONCLUSÃO

A presença de pulsotipos idênticos no ambiente e no produto final do frigorífico-abatedouro avaliado indica a ocorrência de contaminação cruzada. Além disso, cepas geneticamente indistinguíveis foram isoladas durante todo o período de amostragem, o que demonstra a persistência de determinados clones no ambiente dessa indústria.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUTIO, T.; LUNDÉN, J.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; BJÖRKROTH, J.; SJOBERG, A. M.; KORKEALA, H. Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 83– 90, 2002. GANDHI, M., CHIKINDAS, M. *Listeria*: a foodborne pathogen that know to survive. **International Journal of Food Microbiology.** v. 113, p. 1-15, 2007.

GRAVES, L. and SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology,** v 65, p 55 – 62, 2001.

HEIR, E.; LINDSTEDT, B.A.; RØTTERUD, O.J.; VARDUND, T.; GEORG KAPPERUD, G.; NESBAKKEN, T. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 85– 96, 2004.

HUNTER, S. B.; VAUTERIN, P.; LAMBERT-FAIR, M. A.; M. DUYNE, S.V.; KUBOTA, K.; GRAVES, L.; WRIGLEY, D,: BARRETT, T. and RIBOT, E. Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1045–1050, 2005.

ILSI RESEARCH FOUNDATION/RISK SCIENCE INSTITUTE, EXPERT PANEL ON *Listeria monocytogenes* IN FOODS. Achieving Continuous Improvement in Reductions in Foodborne Listeriosis—A Risk-Based Approach. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 9, p. 1932–1994, 2005

MENDONÇA, K. S. Diversidade de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas na região sul do Rio Grande do Sul através de PFGE. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/ UFPel, 2009.

MIETTINEN, M. K.; SIITONEN, A.; HEISKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJORKROTH, K. J.; KORKELA, H. J. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2849-2857, 2002.

NALÉRIO, É. S. Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de frango do sul do Rio Grande do Sul. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/ UFPel, 2007.RAGON, M.; WIRTH, T.; HOLLANDT, F.; LAVENIR, R.; LECUIT, M.; LE MONNIER, BRISSE, A. S. A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. **PLOS Pathogens**, www.plospathogens.org, v. 4, 2008.

WIEDMANN, M. Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, 2002.