

LOREANE DE ANA GUIMARÃES DOS SANTOS

***Listeria monocytogenes* EM SUÍNOS ABATIDOS: SUBSÍDIO AO
SISTEMA DE ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS DE
CONTROLE – APPCC**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
graduação em Medicina Veterinária,
para obtenção do título de “Magister
Scientiae”.**

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

LOREANE DE ANA GUIMARÃES DOS SANTOS

***Listeria monocytogenes* EM SUÍNOS ABATIDOS: SUBSÍDIO AO SISTEMA DE ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE – APPCC**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 19 de dezembro de 2003.

Prof^ª. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Conselheira)

Prof. Mauro Pires Moraes
(Conselheiro)

Prof^ª. Paula Dias Bevilacqua

Prof. José Lúcio dos Santos

Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto
(Orientador)

“Deus é quem efetua em vós tanto o querer como o realizar, segundo a sua boa vontade.
Fazei tudo sem murmurações nem contendas; para que vos torneis irrepreensíveis e
sinceros.”

Filipenses 2:13, 14

AGRADECIMENTOS

“À Universidade Federal de Viçosa, que me proporcionou momentos de aprendizagem intelectual e emocional, além de deliciosos momentos de alegria.

Ao Departamento de Veterinária, pelos conhecimentos aí adquiridos, pelos amigos feitos e pela oportunidade a mim oferecida por meio deste mestrado.

A Deus, pelos ensinamentos, amor e por me conceder todos os demais agradecimentos.

À Igreja Presbiteriana de Viçosa e seu apoio espiritual e de amigo mesmo, sempre presente nos bons e maus momentos e sempre com uma orientação a oferecer.

À cidade de Viçosa, que se mostrou acolhedora e tranqüila, permitindo uma vida sossegada.

Ao papai e a mamãe, pelo auxílio e apoio, pela confiança e carinho sem tamanhos, apenas pelo prazer de ver uma filha seguir adiante.

Ao meu amor, Aloízio, que faz parte das minhas alegrias e me conforta quando desanimado, que me faz mais forte e apaixonada a cada dia.

Aos meus irmãos, Lis' Anna, Lozé e Lisandro, que fazem nossa família completa e feliz, com todas as alegrias e problemas que possam existir; única no meu coração.

Ao Lorenzo e Maria Luiza, sobrinhos que me enchem de saudades ao telefone e de motivação quando estamos juntos.

A minha irmã de coração e melhor amiga Clarice, de rumo tão diferente do meu e ao mesmo tempo uma das pessoas mais próximas (não fisicamente) de mim. Te adoro!.

Ao apoio e exemplo dos meus tios Juninho e Denise.

Aos meus sogros, seu Aloízio e dona Maria das Dores, por me apresentarem à deliciosa comida mineira.

Ao meu orientador Paulo, por me ensinar a trabalhar e a vencer o desânimo, pelos toques nos momentos de atraso.

Aos meus conselheiros Mauro e Cristina, e à prof^a. Paula, sempre tão educados e presentes.

Aos meus maravilhosos amigos de risadas e de lágrimas: o JD (Cynthia, Fernanda, Kátia, Letícia lêite e Letícia cenourão, Lílian bichinho, Renata e Vanessa).

A G7 (Fabrícia, Shara, Lílian, Gyanini, Cris, Sílvia).

Às colegas de mestrado e orientador, Vanessa e Lílian.

À descoberta de amizades como a de Sabrina, Andreza e Abelardo, Glênia e Bruno.

Aos meus companheiros de turma na graduação, os meninos adoráveis com os quais convivi, como Thiago, Nilo, Danilo, Léo, Eduardo, Fred Boy, Fredinho, Cyril, Marcinho, André, Emerson, Holdai e todos os demais que eu adoro.

A todos que passaram por minha vida e que de alguma forma participaram da minha construção, e aos que ainda passarão.

BIOGRAFIA

Loreane de Ana Guimarães dos Santos, filha de Loren José Guimarães dos Santos e Maria de Lourdes Guimarães dos Santos, nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, no Espírito Santo, a 02 de maio de 1978.

Em 1995 concluiu o segundo grau, na escola de segundo grau “Guimarães Rosa”. Em março de 1997 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, em Minas Gerais, no curso de Medicina Veterinária, concluindo a graduação em maio de 2002.

Em abril de 2002 começou a cursar o mestrado em Medicina Veterinária, na mesma instituição, onde defendeu tese no dia 19 de dezembro de 2003.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1.INTRODUÇÃO.	11
REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. <i>Listeria</i> sp: histórico, características gerais e diagnóstico.....	13
2.3. Microbiota da carne suína.....	18
2.4. Influência do processo de abate na carne suína	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Amostragem e delineamento experimental:	24
3.2. Ensaio microbiológicos.....	26
Pesquisa de <i>Listeria</i> sp por técnica convencional	27
Pesquisa de <i>Listeria</i> sp por técnica PCR	28
3.3. Análise Estatística	29
5. CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
7. APÊNDICES	43
7.1. APÊNDICE 1 - Características bioquímicas	44
7.2. APÊNDICE 2 - Fluxograma de matadouro-frigorífico de suínos inspecionado.....	45
7.3. APÊNDICE 3 - Fluxograma de matadouro de suínos não inspecionados.	46
7.4. APÊNDICE 4 - Análise de custo	47

RESUMO

SANTOS, Loreane de Ana Guimarães dos, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2003. ***Listeria monocytogenes* em suínos abatidos: subsídio ao Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC**. Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto. Conselheiros: Maria Cristina Dantas Vanetti e Mauro Pires Moraes.

Foi objetivo deste trabalho a análise da *Listeria monocytogenes* como perigo microbiológico em alguns pontos do processo de abate de suínos, visando determinar sua importância para o sistema APPCC. Também avaliou-se estabelecimentos não inspecionados, onde o objetivo foi a identificação de um melhor local para obtenção de amostra (carcaça ou tonsila) e a comparação de exame microbiológico convencional com a técnica de PCR, com respeito a maior eficiência e menor custo com reagentes e meios de cultura; nesses estabelecimentos o momento de coleta de amostra de carcaça e tonsila restringiu-se à etapa final de abate. As amostras de carcaça, no estabelecimento inspecionado, foram obtidas de esfregaços superficiais (“swabs”) em quatro pontos do fluxograma do abate inspecionado: após a depilação (A), antes (B) e após a evisceração-serragem (C) e após o resfriamento (D), os “swabs” foram analisados por técnica convencional de isolamento e identificação. Não houve diferença significativa, com nível de significância de 5%, para a ocorrência de *L. monocytogenes* entre os pontos do fluxograma ($p = 0,288$), nem para *Listeria* sp ($p = 0,565$), mas o microrganismo foi isolado nos pontos C e D, merecendo monitoramento durante estas fases. No estabelecimento não inspecionado a comparação entre amostras de “swabs” e tonsila não apresentou diferença

significativa para *L. monocytogenes* ($p = 0,47$), nem para *Listeria* sp, quando se realizou pesquisa convencional, com confirmação deste resultado usando-se pesquisa por PCR ($p = 0,196$) para *L. monocytogenes*. A PCR mostrou-se uma técnica mais eficiente para pesquisa do microrganismo no “swabs” ($p = 0,00001$) e na tonsila ($p = 0,00005$). *L. monocytogenes* é um perigo que demanda um monitoramento nas etapas de evisceração e serragem das carcaças e na refrigeração no estabelecimento inspecionado investigado, a determinação de sua presença pode ser realizada a partir de esfregaço da carcaça assim como de fragmentos de tonsila. A técnica de PCR é rápida, eficiente, e de menor custo com reagentes e meios de cultura na pesquisa de *L. monocytogenes*. Nos estabelecimentos de abate investigados a bactéria pode ser um perigo e sua falta de controle nestes locais oferece risco à saúde do consumidor.

ABSTRACT

SANTOS, Loreane de Ana Guimarães dos, M.S. Universidade Federal de Viçosa, december 2003. ***Listeria monocytogenes* in swines slaughtered: aid to the Hazards Analysis and Critical Control Points (HACCP)**. Adviser: Paulo Sérgio de Arruda Pinto: Committee members: Maria Cristina Dantas Vanetti and Mauro Pires Moraes.

It was objective of this work the analysis of the *Listeria monocytogenes* as microbiologic hazard in some points of slaughtering process in inspected swines, seeking to determine your importance for the system APPCC. It was also evaluated not establishments inspected, where the objective was the identification of a better place for sample obtaining (carcass or tonsil) and the comparison of exam conventional microbiologic with the technique of PCR, with regard to larger efficiency and smaller cost with reagents and culture means; in those establishments the moment of collection of carcass and tonsil samples limited to the final stage of slaughtering process. The carcass samples, in the inspected establishment, they were obtained of swabs in four points of the fluxogram of the inspected slaughtering process: after the depilation (A), before (B) and after the evisceration–sawing (C) and after the refrigeration (D), the swabs were analyzed by conventional technique of isolation and identification. There was not significant difference, with level of significância of 5%, for the occurrence of *L. monocytogenes* among the points of the fluxogram ($p = 0,288$), nor for *Listeria sp* ($p = 0,565$), but the microorganism was isolated in the points C and D, deserving monitoring during these points. In the establishment not inspected the comparison between swabs samples and tonsil it didn't present significant difference for *L. monocytogenes* ($p = 0,47$), nor for *Listeria sp*, when it

took place conventional research, with confirmation of this result using PCR ($p = 0,196$) for *L. monocytogenes*. PCR was shown a more efficient technique for research of the microorganism in the swabs ($p = 0,00001$) and in the tonsil ($p = 0,00005$). *L. monocytogenes* is a danger that demands a monitoring in the evisceration stages and sawing of the carcasses and in the refrigeration in the establishment inspected investigated, the determination of your presence can be accomplished starting from swab of the carcass as well as of tonsil fragments. PCR is a technique fast, efficient, and of smaller cost with reagents and culture means in the research of *L. monocytogenes*. In the slaughtering establishments investigated the bacteria it can be a hazard and your control lack in these places it offers risk to the consumer's health.

1.INTRODUÇÃO

Listeriose é uma doença que pode ser associada ao consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*. Um grande número de casos de listeriose vem ocorrendo nos últimos anos, em função da mudança no estilo de vida dos consumidores, que se utilizam cada vez mais da cadeia do frio no processo de produção de alimentos prontos para o consumo, aumentando a sua exposição a *L. monocytogenes* e outros microrganismos patogênicos psicrotóxicos.

Com distribuição mundial, o microrganismo pode ser encontrado no solo, nas vegetações, no intestino de animais e humanos portadores, no leite de vacas mastíticas ou não, na carne e em superfícies de contato de alimentos. O processo de abate de suínos pode ser visto como uma oportunidade potencial de transmissão da listeriose por contaminação da carne durante o abate, por isso a aplicação de um sistema que vise controlar a presença de *L. monocytogenes* durante as etapas do abate pode ser uma boa medida de segurança aos consumidores.

O sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), desenvolvido há cerca de trinta anos, enfoca a segurança dos alimentos da colheita ou produção até o consumo, trabalhando 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 identificado e a escolha de

respectivos procedimentos de abate, visando o estabelecimento de ações corretivas quando o processo se desvia do controle.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a contaminação superficial de carcaças e de tonsilas suínas com *Listeria monocytogenes*, em estabelecimentos de abate inspecionados ou não, como subsídio ao controle de qualidade da carne suína, sobretudo quanto ao sistema APPCC.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Listeria* sp: histórico, características gerais e diagnóstico

O histórico de *Listeria monocytogenes* e listeriose data desde o século XVII. Em 1889, Pfeiffer descreveu uma doença humana de causa obscura, provavelmente a listeriose. Mas foi Hüllers quem primeiro isolou o agente da doença a partir de fígado de coelho, em 1919, na Suécia (Corrêa & Corrêa, 1992). A primeira descrição do microrganismo foi feita por Murray *et al.* em 1926, denominando-a *Bacterium monocytogenes* devido à intensa monocitose observada em coelhos e cobaias infectados em laboratório. No ano seguinte, em 1927, Pirie propôs renomear a espécie, denominando-a *Listerella monocytogenes*, devido ao fato de ter observado doença semelhante à caracterizada por Murray *et al.* (apud Corrêa & Corrêa, 1992). em roedores selvagens; como já existia um gênero vegetal chamado *Listerella* resolveu-se denominar o novo microrganismo de *Listeria monocytogenes*. O primeiro isolado obtido de humanos infectados com descrição do microrganismo foi feito por Nyfeldt, em 1929 (Faber & Peterkin, 1991; Corrêa & Corrêa, 1992; Loguercio *et al.*, 2001).

No gênero *Listeria* destacam-se as seguintes espécies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivannovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. murrayi* e *L. grayi* (Faber & Peterkin, 1991; Corrêa & Corrêa, 1992).

A distribuição de *L. monocytogenes* é ubiqüitária, podendo ser encontrada no solo, na vegetação, no intestino de humanos e animais doentes ou portadores, assim como na silagem, esgotos, abatedouros/matadouros e no leite oriundo de vacas mastíticas ou não

(Faber & Peterkin, 1991; Acha & Szyfres, 1994; Germano & Germano, 2001; Jemmi *et al.*, 2002).

L. monocytogenes pode ser encontrada em diversos alimentos de origem animal ou outros alimentos passíveis de contaminação por fezes ou secreção nasal, urina, pus ou sangue de humanos ou animais doentes em alguma fase de seu processamento. Dentre os alimentos freqüentemente infectados encontram-se leite e seus derivados, carne de bovinos, eqüinos, aves e suínos, pescados e alimentos processados em geral (Prentice, 1994, Tobia *et al.*, 1997, DeMartinis & Franco, 1998, Silva *et al.*, 1998, Borch *et al.*, 1999, Destro, 2000, Leclerc *et al.*, 2002, Meyer-Broseta *et al.*, 2002, Silva *et al.*, 2002).

Bactérias do gênero *Listeria* são Gram-positivas, bastonetes regulares, não-esporegênicas, catalase positivas e não produtoras de H₂S. Possuem capacidade de crescimento numa ampla faixa de temperatura (3 a 45°C), sendo a faixa ótima de 30 a 37°C. São consideradas psicotróficas, devido à capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. Chasseignaux *et al.* (2002) observaram que algumas estirpes podem se multiplicar a 0,5°C até -0,2°C. As bactérias do gênero *Listeria* apresentam capacidade de movimentação, com uma motilidade característica, que se manifesta de 20 a 25°C, com movimentos rotatórios ou de tombamento, mas a 37°C são imóveis. São anaeróbias facultativas, fermentando a glicose com produção de ácido lático, mas não produzem gás (Faber & Peterkin, 1991, Corrêa & Corrêa, 1992, Silva *et al.*, 1997).

Conforme Lovett & Twedt (1988), somente as espécies hemolíticas são patogênicas, e dentro destas *L. monocytogenes* assume papel de importância como um perigo potencial para animais e humanos. A capacidade de produzir hemolisina e de não produzir ácido a partir de D-xilose são fortes elementos para diferenciar *L. monocytogenes* de espécies de *Listeria avirulentas*.

Na Suíça, desde de 1987, vem sendo introduzido um limite legal da presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo e em 1999, foi determinado que *L. monocytogenes* deveria estar ausente em 25 gramas de alimentos prontos para o consumo, valendo também para peixes defumados resfriados e sorvetes (Jemmi *et al.*, 2002). A legislação brasileira determina ausência de *L. monocytogenes* em 25 gramas de queijo, mas para outros alimentos, como produtos cárneos, ainda não existe um limite padrão

(ANVISA, 2001). Dada a possibilidade da presença de *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos de origem suína a sua pesquisa deveria ser levada em consideração na avaliação do risco de transmissão da listeriose para o ser humano, como o preconizado para leite, queijos, sorvetes, dentre outros na legislação brasileira.

A pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos pode ser realizada utilizando-se métodos de cultivo tradicionais seguidos de caracterização bioquímica, ou por meio de técnicas alternativas.

Como métodos convencionais de pesquisa de *L. monocytogenes* por análise microbiológica encontram-se o método desenvolvido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), usualmente aplicado à análise de carne, produtos cárneos e esfregaços de superfícies, e o método da Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA), usualmente aplicado à análise de leite e produtos lácteos (Silva *et al.*, 1997).

Farber e Peterkin (1991) comentaram que os métodos convencionais podem ser laboriosos e apresentarem resultados variáveis. Como técnicas alternativas apresentam-se os “kits” de detecção de *L. monocytogenes* que podem ser usados após o enriquecimento primário, PCR, ribotipagem, PCR 5`nuclease, nested PCR, amplificação ao acaso do DNA plimórfico (RAPD), eletroforese em gel 2 - D, dentre outros (Norton e Batt, 1999; Byuna *et al.*, 2001; Chasseignaux *et al.*, 2002; Holko *et al.*, 2002; Jaradat *et al.*, 2002; Kanuganti *et al.*, 2002).

Vários autores, pesquisando *L. monocytogenes* em alimentos usando PCR como técnica diagnóstica, despenderam, no máximo, 36 horas para obtenção do resultado (Jaradat *et al.*, 2002; Kanuganti *et al.*, 2002; Holko *et al.*, 2002) enquanto que a pesquisa por técnicas convencionais pode chegar a 14 dias (Holko *et al.*, 2002; Jemmi *et al.*, 2002; Meyer-Broseta *et al.*, 2002).

2.2. *Listeria* sp como um perigo para a Saúde Pública

Atribui-se a *L. monocytogenes* uma grande importância no que diz respeito à representatividade de um perigo microbiológico, considerando que ela é patogênica para o ser humano. Destacando sobre a maioria dos patógenos de origem alimentar, as principais manifestações clínicas de listeriose são parecidas com um resfriado, com febre baixa, mal-estar geral, podendo progredir para uma meningite, meningo-encefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro (McLauchlin, 1996; Loguercio *et al.*, 2001). A taxa de letalidade encontra-se entre 20 a 30% dos casos diagnosticados, excedendo, inclusive, a de *Clostridium botulinum* (McLauchlin, 1996). Mesmo havendo probabilidade de risco para todos os consumidores este patógeno é potencialmente mais perigoso para neonatos, prematuros, idosos, gestantes e pacientes imunodeprimidos (Schuchat *et al.*, 1992; Rocourt *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 1999).

No estabelecimento da doença interferem fatores como virulência e patogenicidade do microrganismo, temperatura do inóculo, variável capacidade de crescimento em alimentos ou outros meios, condição hormonal do hospedeiro, presença ou ausência de cátions divalentes tais como Fe^{++} e Mg^{++} , interferência bacteriana no trato gastrointestinal, pois as estirpes mais virulentas parecem aderir mais nas células intestinais (Schlech, 1988).

Como um parasita intracelular facultativo, *L. monocytogenes* pode, após atingir a circulação sanguínea, via intestino, penetrar nos macrófagos, onde começa a se multiplicar até levar a ruptura da célula parasitada e, em seguida, dá-se a fase de disseminação, com um quadro de septicemia no organismo infectado, atingindo partes como o sistema nervoso central, olhos, coração, placenta e o feto (Lovett & Twedt, 1988).

De 1950 a 1959, um total de 500 casos foram identificados na Alemanha, sendo que esse número aumentou para 1.500 casos de 1960 até 1966. Esse aumento no número de casos registrados num período de tempo menor também aconteceu nos Estados Unidos; registrando-se 184 casos entre 1933 e 1958, enquanto que de 1959 até 1966, 547 casos foram reportados (Acha & Szyfres, 1994). Um surto de listeriose ocorrido em 1987 na Suíça levou à introdução de um regulamento que considerasse esta doença como parte do Sistema de Notificação Suíço (Swiss Federal Office of Public Health) e, desde então, a incidência anual de listeriose humana varia de 0,3 a 0,7 casos por 1.000 indivíduos (Jemmi

et al., 2002). Segundo Eley (1994), no Reino Unido, 500 casos de listeriose foram reportados em 1988 e neste mesmo ano, quase 30.000 casos de salmonelose e campilobacteriose foram também reportados. Atualmente a incidência de *Listeria* em alimentos parece ser mais comum do que dos clássicos patógenos Gram-negativos entéricos.

No Brasil, *Listeria* têm sido isolada em vários estados, e em diversos produtos de origem animal (lácteos, cárneos, pescados) e vegetal, conforme pode ser observado no quadro abaixo:

Quadro 1 - Distribuição das amostras (%) de *Listeria* segundo a fonte de isolamento e as origens geográficas:

Estados	Produtos				Total
	Lácteos	Cárneos	Pescado	Vegetal	
GO	15 (0,6)	1371 (58,8)	-	-	1386 (59,4)
MG	6 (0,2)	398 (17,1)	-	-	404 (17,3)
SP	146 (6,2)	158 (6,7)	-	-	304 (13,0)
RJ	18 (0,7)	133 (5,7)	-	6 (0,2)	157 (6,7)
RS	43 (1,8)	25 (1,0)	3 (0,1)	-	71 (3,0)
SC	-	-	8 (0,3)	-	8 (0,3)
Total	228 (9,7)	2085 (89,4)	11 (0,4)	6 (0,2)	2330 (100,0)

GO - Goiás; MG - Minas Gerais; SP - São Paulo; RJ - Rio de Janeiro; RS - Rio Grande do Sul; SC - Santa Catarina.

FONTE: Hofer (2001).

A existência de grupos de risco associada ao fato do microrganismo ser passível de isolamento em alimentos processados do tipo “pronto para consumo” tem despertado o interesse de indústrias alimentícias, autoridades de Saúde Pública e de pesquisadores em vários países. Devido à natureza psicrotrófica de *L. monocytogenes* a preocupação tornou-se ainda maior, pois o risco de listeriose aumenta na proporção direta da produção crescente de alimentos frescos e processados, prontos para o consumo, e que usualmente são conservados sob temperatura de refrigeração (Loguercio *et al.*, 2001).

A simples presença de um único patógeno na carne é significativa do ponto de vista de saúde pública, pois a dose mínima infectante de certos microrganismos, como *L. monocytogenes*, é baixa e é possível a sua multiplicação posterior, devido às falhas de manipulação e refrigeração (Berends *et al.*, 1997). A dose mínima infectante de *L. monocytogenes* não é conhecida, mas parece ser da ordem de 10^3 UFC (McLauchlin, 1999).

2.3. Microbiota da carne suína

Os produtos cárneos suínos estão envolvidos com a veiculação de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) que causam intoxicação e infecção; o USDA considera o suíno como uma importante fonte de contaminação (McMullen, 2000). Dentre os patógenos freqüentemente isolados de carcaças suínas no ano de 1996, encontra-se *L. monocytogenes*, apresentando capacidade de crescimento em temperaturas de refrigeração pois é a única com capacidade de crescimento a 4 °C, entre outros patógenos como *Aeromonas* sp, *Shigella* sp, *Plesiomonas shigelloides*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*.

Korsak *et al.* (1998), avaliando patógenos causadores de doenças de origem alimentar, dentre outros, detectaram a presença de *L. monocytogenes* na superfície de carcaças suínas e reafirmaram que os referidos patógenos estão relacionados como os principais riscos para a saúde pública.

Nos últimos 10 anos, na França, os produtos de origem suína se mostraram mais freqüentemente envolvidos em surtos de listeriose do que os produtos derivados do leite, ressaltando a importância de se desenvolver mais pesquisas buscando a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos e na carne *in natura* (Leclerc *et al.*, 2002).

Segundo Chasseignaux *et al.*, (2002) a freqüência de *L. monocytogenes* na carne crua, em geral se encontra acima de 40%, dependendo do tipo de produto. Na França, onde os diferentes surtos têm sido associados com produtos suínos processados; os estudos revelaram que a freqüência do patógeno na carne crua suína está em 16% e cerca de 68% dos matadouros amostrados apresentaram contaminação por *L. monocytogenes* em suas superfícies de trabalho.

2.4. Influência do processo de abate na carne suína

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 *et al.* (1996).

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 alimentos livres de patógenos, uma vez que *L. monocytogenes* pode estar presente na ração animal, limpeza adequada e desinfecção dos equipamentos e locais, treinamento e higiene dos funcionários envolvidos, contribuem para a redução dos níveis de contaminação dos animais na fazenda (McMullen, 2000).

L. monocytogenes também foi considerada um contaminante presente no ambiente de abate por Borch *et al.* (1996). De acordo com esses autores, *Listeria* sp e *L. monocytogenes* parecem ser um problema localizado no matadouro podendo funcionar como indicadores gerais do estado de higiene em que se encontra o estabelecimento estudado. *Listeria* sp e *S. aureus* foram ainda considerados por esses mesmos autores como indicadores do sucesso do programa de boas práticas de fabricação.

Chasseignaux *et al.* (2002) analisaram a presença de *L. monocytogenes* colonizando superfícies de trabalho em plantas de processamento de carne suína e as superfícies foram consideradas pelos autores como a principal fonte de contaminação da carne. *L. monocytogenes* também foi encontrada colonizando equipamentos da área de recepção assim como nos equipamentos da área de processamento. Após as operações de limpeza e desinfecção a contaminação reduziu em um dos estabelecimentos investigados e desapareceu nos outros dois estabelecimentos, e os autores atribuíram este fato aos hábitos de higiene aprimorados nos estabelecimentos.

De acordo com Trémoulet *et al.* (2002) *L. monocytogenes* pode ser isolada de superfícies na linha de processamento de alimentos e pode sobreviver nesses ambientes por muitos meses. Para bactérias, a capacidade de crescer em superfícies formando biofilmes é consequência de uma estratégia de sobrevivência adotada por muitas espécies, incluindo *L. monocytogenes*. A capacidade de formar biofilmes oferece ainda aumento de resistência do microrganismo aos agentes sanitizantes (Lundén *et al.*, 2002).

Considerando que o processo de abate oferece várias oportunidades de contaminação da carne suína, seja a partir do animal como dos procedimentos de abate (Carr *et al.*, 1998), o monitoramento de algumas etapas buscando determinar pontos críticos em potencial permite estabelecer medidas de controle de contaminação microbiana.

A Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration-FDA-USA) se posicionou com relação a listeriose, enfatizando que *L. monocytogenes* merece ser monitorada nas Boas Práticas de Fabricação e no sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle no processamento de alimentos cozidos e prontos para consumo (Shank *et al.*, 1999).

Num processo de abate de suínos algumas etapas são vistas como pontos críticos de controle (PCCs) para diversos perigos microbiológicos, dentre eles *L. monocytogenes*. A avaliação da carne suína buscando a presença de *L. monocytogenes* no processo de abate tem sido alvo de estudos e revisão tanto na Europa como nos EUA e Canadá (Borch *et al.*, 1996; Smulders *et al.*, 1998). No entanto, trabalhos nacionais que busquem determinar a ocorrência de *L. monocytogenes* em estabelecimentos de abate de suínos ainda são pouco divulgados.

De acordo com Borch *et al.* (1996), o processo de abate oferece muitas oportunidades de contaminação da carcaça suína com bactérias potencialmente patogênicas, sem a existência de um ponto no qual o perigo seja completamente eliminado. Dados sobre a ocorrência de várias bactérias patogênicas como *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* em suínos, suas características de crescimento e sobrevivência e capacidade para tornarem-se estáveis durante a linha de abate vêm sendo divulgados.

Listeria sp pode ser isolada de carcaças em etapas do abate, na medida que animais doentes ou sadios podem veicular a bactéria principalmente via intestino (Brakett, 1988; Uboldi Eiroa, 1990; Faber & Peterkin, 1991). O isolamento da *Listeria* sp realizado em efluentes de matadouros também reforçam esta possibilidade (Watkins & Sleath, 1981; Garcia, 1993). Ademais, o congelamento, a desidratação superficial e o resfriamento não parecem afetar a sobrevivência da *Listeria* sp na carne (Faber & Peterkin, 1991).

Os principais pontos de contaminação durante o abate de suínos estão associados às origens fecal, faringiana e ambiental (Borch *et al.*, 1996). Esses mesmos autores destacaram que *A. hydrophyla*, *S. aureus*, e *L. monocytogenes* são as principais bactérias relacionadas com o ambiente de abate. *Listeria* sp pode ser isolada de alimentos que

tiveram contato com superfícies, pisos e paredes do matadouro (Luchansky e Dougle, 1991; Chasseignaux *et al.*, 2002).

A inspeção de um estabelecimento de abate pode ser executada em várias instâncias da administração pública, dependendo do destino final da carne. Em se tratando de uma comercialização interestadual ou internacional o órgão responsável pela garantia da qualidade e inocuidade do produto do abate é o Serviço de Inspeção Federal (SIF). Se a comercialização restringe-se ao âmbito intermunicipal, dentro de um mesmo estado, a fiscalização é realizada pelo Serviço de Inspeção Estadual. Quando a carne é comercializada dentro do próprio município em que o animal foi abatido, a responsabilidade cabe ao Serviço de Inspeção Municipal. Em todos estes níveis se preconiza um controle sanitário do abate, de modo a assegurar a saúde dos consumidores da carne ou produtos cárneos oriundos dos referidos estabelecimentos.

O abate de animais em estabelecimento não inspecionado é conhecido como clandestino. Animais abatidos nesse tipo de estabelecimento não apresentam o carimbo da inspeção sanitária na carcaça e as carnes obtidas não possuem qualquer certificado de procedência. O abate clandestino de animais constitui-se em crime de sonegação fiscal, permitindo também o lançamento no mercado de carnes oriundas de animais de descarte ou doentes; não existem estatísticas confiáveis sobre o volume de abate nestas condições e a estimativa pode oscilar entre 20 a 90% (Unesp, 2003).

A pesquisa de *L. monocytogenes* em algumas etapas do abate pode ser considerada um importante auxílio na determinação de pontos críticos de controle para o referido microrganismo, permitindo a tomada de decisões para controlar sua presença na carcaça suína durante o processo de abate, em estabelecimento inspecionado que aplica o sistema APPCC.

Dentre as etapas do abate de suínos, algumas podem permitir a redução do número de contaminantes, incluindo *L. monocytogenes*. O procedimento de escaldamento leva de 6 a 8 minutos e a temperatura da água é de 60 a 61,5°C. A redução do número de bactérias na carcaça durante o escaldamento depende das condições tempo-temperatura usadas (Sörquist, 1990). O chamuscamento (tratamento com chama) correto da carcaça eleva a temperatura da carcaça e reduz significativamente, a sua contaminação microbiana

superficial, embora não seja suficiente para eliminá-la. Como o chamuscamento é a última etapa que provoca redução de bactérias, a carga final de bactérias na carcaça, em geral, é determinada pelas operações de toaleta, evisceração, inspeção e outras etapas posteriores (Berends *et al.*, 1997).

Durante a evisceração e a inspeção *post mortem* ocorre disseminação de bactérias para a carcaça e vísceras devido às incisões praticadas. Bactérias se disseminam para a carcaça durante a evisceração, devido ao conteúdo gastrointestinal e à contaminação oral e esofágica (Borch *et al.*, 1996). Berends *et al.* (1998) ressaltam que a validação da técnica de evisceração deve ser feita através de repetidos exames microbiológicos para microrganismos indicadores.

A serragem das carcaças promove a transferência de microrganismos da incisão retal e da cabeça para a carcaça, requerendo a desinfecção da serra a cada carcaça, cuja eficiência está diretamente ligada à velocidade de abate (Borch *et al.*, 1996).

A lavagem da carcaça, sobretudo da cabeça, leva à contaminação microbiana do ambiente de abate a partir de sangue e contaminações orais e gastrointestinais, predispondo a multiplicações posteriores (Borch *et al.*, 1996).

Uma vez contaminada a linha de abate, principalmente máquinas, facas e mãos, essas superfícies servem de fontes de contaminação cruzada durante o abate, as duas últimas muito mais, até que a higienização seja efetuada, nos intervalos ou no final do abate (Borch *et al.*, 1996; Berends *et al.*, 1997).

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 (OMS) considerou que uma forma fundamental de transmissão da doença ao homem seja através de alimentos contaminados durante sua produção e processamento (Destro & Serrano, 1990), podendo se dar por meio das mãos dos manipuladores, o que justifica uma ênfase na higienização adequada das mãos dos operários.

Portanto, a contaminação da carcaça suína pode se dar a partir do animal, doente ou portador, a partir do intestino para a carcaça por meio das operações desenvolvidas durante

o abate, ou ainda por meio de contaminação via manipulador, quando o mesmo se encontra doente ou portador e não faz uma higienização correta das mãos.

Durante o processamento a carcaça pode ser recontaminada, e a lavagem com ácidos orgânicos após a evisceração e a possibilidade do uso de tratamentos antimicrobianos deve ser incorporada ao sistema APPCC com a finalidade de reduzir a carga microbiana possivelmente presente na carcaça. O uso de banhos com ácidos orgânicos e de culturas bioprotetoras diminuem a incidência de *L. monocytogenes* na carne suína e devem ser consideradas como medidas importantes no controle deste microrganismo, uma vez que as temperaturas de refrigeração não são suficientes para controlar o desenvolvimento de *Listeria* (McMullen, 2000; Williams e Golden, 2001).

Entre alternativas para inibir o crescimento de *L. monocytogenes* está a inoculação de bacteriocinas no produto. Em lingüiças brasileiras DeMartinis & Franco (1998) utilizaram bacteriocinas com obtenção de bons resultados. Após quatro semanas a 8°C, as amostras inoculadas com a estirpe de *Lactobacillus sake 2a* apresentaram contagem reduzida em cerca de 6 log comparando com o controle contendo somente *L. monocytogenes*. O *Lactobacillus sake 2a* produz um tipo de bacteriocina que pode ser usada para inibir a multiplicação da *L. monocytogenes* em salsichas e demais produtos cárneos.

Medidas de prevenção e controle da contaminação da carcaça por *L. monocytogenes* permitem o processamento de alimentos seguros em etapas posteriores, minimizando riscos para o consumidor (Soriano *et al.*, 2002).

Considerando a qualidade e a quantidade de dados científicos atualmente disponíveis sobre a contaminação de carcaças e tonsilas de suínos com *Listeria sp*, pode-se ressaltar a necessidade de outras pesquisas, inclusive com determinações de risco mais acuradas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem e delineamento da investigação:

Visando os ensaios microbiológicos, as amostras foram coletadas em ambientes de abate num Matadouro-Frigorífico de suínos, localizado em Minas Gerais, fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal e em três estabelecimentos não inspecionados localizados em Minas Gerais.

No estabelecimento inspecionado as amostras foram constituídas, aleatoriamente, de 120 carcaças de suínos, obtidas em diversos dias de coleta. As amostras de “swabs” superficiais de carcaças foram coletadas em quatro pontos distintos do processo de abate, descritos abaixo, foram coletadas 30 amostras por ponto. No estabelecimento não inspecionado além da coleta de 30 carcaças realizada ao final do abate, realizou-se também a coleta das tonsilas dos respectivos animais.

Cada unidade amostral (carcaça) foi composta de sete subamostras coletadas de partes pré-estabelecidas da superfície externa e interna de cada carcaça; em diferentes etapas do abate inspecionado: após a depilação (ponto A) e imediatamente antes da evisceração (ponto B), quando selecionamos 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 centrolateral do ventre de uma das meias-carcaças (Figura 1).

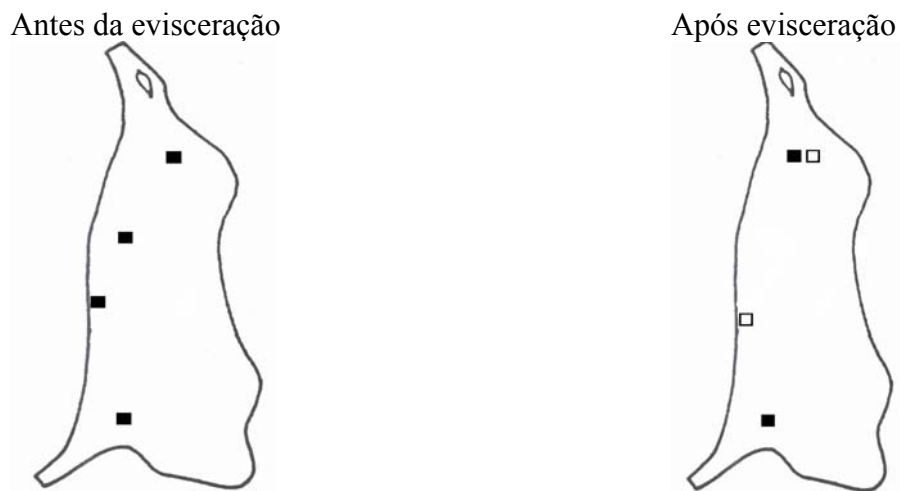


Figura 1 - Locais de coleta dos esfregaços de superfície de carcaça:

A área a ser amostrada para coleta em carcaças foi delimitada por moldes estéreis com área interna livre de 20 cm² por ponto de coleta (Figura 2), onde foram efetuados os esfregaços com o uso de “swabs” (5 mm de diâmetro) devidamente esterilizados e previamente umedecidos em solução salina estéril a 0,85%. Durante a coleta, os “swabs” de cada amostra foram reunidos em um mesmo saco plástico estéril evitando-se ao máximo a contaminação do material pelas mãos do operador quebrando-se os “swabs” dentro do saco estéril e remetendo-os sob refrigeração ao laboratório.

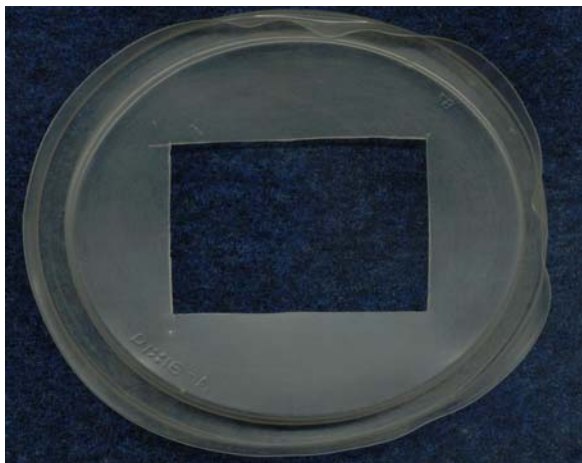


Figura 2 - Molde utilizado na coleta de amostras

No estabelecimento inspecionado, as amostras de carcaças foram analisadas por meio de pesquisa microbiológica convencional (isolamento e identificação) de *Listeria* sp e *L. monocytogenes*.

Nos estabelecimentos não inspecionados, além da pesquisa convencional de *Listeria* sp e *L. monocytogenes*, realizou-se por PCR, a pesquisa de *L. monocytogenes* nas amostras de carcaça.

Ainda foram coletas nos estabelecimentos não inspecionados, 30 tonsilas após a evisceração; sua remoção foi feita com o auxílio de pinças e tesouras autoclavadas e armazenada em saco estéril, mantidos sob refrigeração até o processamento das amostras. As amostras de tonsilas também foram analisadas por meio de pesquisa convencional e por PCR, como as carcaças.

As amostras foram analisadas nos Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal - Departamento de Veterinária e de Virologia - Bioagro, ambos da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Análises microbiológicas

As amostras de carcaças foram homogeneizadas, no dia da coleta, em 140 mL de água peptonada, durante 1 minuto, em homogeneizador peristáltico (Stomacher). Cinquenta

militros do homogenato foram destinados à pesquisa de *L. monocytogenes*, sendo cada 25 mL utilizados em métodos de enriquecimento seletivo primário distintos.

Pesquisa de *Listeria* sp por técnica convencional

A determinação da presença de *L. monocytogenes* foi feita por adaptação da técnica descrita no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture-USDA) (Silva *et al.*, 1997). Os meios de cultura foram preparados no Laboratório de Inspeção do Departamento de Veterinária, seguindo metodologia descrita por Silva *et al.* (1997).

No enriquecimento seletivo primário 25 mL da amostra, previamente homogeneizada, foram cultivados em 225 mL de Caldo Universidade de Vermont e incubados a 30°C por 24 horas. Paralelamente, também foi feita a inoculação de 25 mL da amostra em Caldo de Enriquecimento para *Listeria*, apenas como auxiliar na pesquisa do microrganismo. O enriquecimento seletivo secundário foi feito transferindo-se alíquotas de 0,1 mL dos caldos de enriquecimento seletivo primário, previamente agitados delicadamente, para tubos com 10 mL de Caldo Fraser. Seguiu-se de incubação a 35°C por 24 horas.

Dos meios de enriquecimento secundário que apresentaram escurecimento do meio, indicando hidrólise da esculina, foi retirada uma amostra com alça de repicagem que foi estriada em placa de Ágar Oxford Modificado. Em caso negativo de escurecimento, o caldo Fraser foi incubado novamente e repetiu-se a observação da hidrólise da esculina após 40 horas de incubação, submetendo ao plaqueamento as amostras positivas e descartando-se as amostras negativas. 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 rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina.

Para a confirmação do gênero *Listeria* e identificação da espécie, selecionou-se, pelo menos, três colônias típicas de cada placa de Ágar Oxford Modificado, que foram estriadas em placas de Ágar Tripticaseína e Soja (suplementado com 0,6% de extrato de levedura), para purificação. Após incubação a 30°C por 24 a 48 horas as colônias foram

observadas sob luz oblíqua, num ângulo de 45°. Foram selecionadas as colônias azuladas típicas, bem isoladas para a identificação da espécie.

As provas para a identificação constituíram-se de coloração de Gram, catalase, motilidade em ágar sulfeto indol motilidade de 20°C a 25°C, redução do nitrato, atividade hemolítica, fermentação da dextrose, xilose, ramnose, manitol, maltose e esculina e teste de CAMP. Como prova seletiva para membros do gênero *Listeria* foi utilizada a prova da motilidade, pois a motilidade da *Listeria* é típica e de fácil visualização em ágar semi-sólido, sendo reconhecida pelo formato de “guarda-chuva”. A partir do resultado positivo nesta prova as demais provas de identificação foram realizadas e foram consideradas *Listeria monocytogenes* os isolados com reações típicas, conforme apresentado por Prentice (1994).

Pesquisa de *Listeria* sp pela técnica da PCR

Para o ensaio de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi utilizado o cultivo oriundo dos homogenatos de “swabs” em água peptonada e fragmentos de tonsila ressuspenso em TE, que seguiram para centrifugação tendo seu sedimento homogeneizado em Tampão TE, para extração do DNA bacteriano e posterior análise de PCR. As amostras de DNA foram obtidas pelo método de extração fenol:clorofórmio, realizado segundo metodologia padrão descrita por Sambrook *et al.* (1989), distribuídas em tubos de eppendorf e estocadas a -20°C. Antes das subseqüentes separações para uso, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente.

O preparo do DNA bacteriano consistiu na centrifugação das alíquotas em tubos eppendorf, com dispensa do sobrenadante e resuspensão do “pellet” em 200 µL de Tampão TE. Adicionou-se mais 500 µL de tampão de extração. A nova solução foi homogeneizada e incubada a 37°C, por aproximadamente uma hora, até que o material se tornasse viscoso. Após esse período, adicionou-se 20 µL de proteinase K seguido de nova homogeneização e banho-maria a 56°C até que todo o material estivesse lisado, em torno de 30 minutos. Adicionou-se então um volume de fenol que correspondesse ao mesmo volume presente no eppendorf, que foi homogeneizado por inversão, seguido de centrifugação a 5000 g por 15 minutos. Após esse período, coletou-se a fase aquosa (superior) para um novo tubo

epENDORF, onde se adicionou igual volume de fenol: clorofórmio (1:1), homogeneizando e centrifugando a 5000 g por 15 minutos, respectivamente. Mais uma vez, a fase aquosa (superior) foi coletada para um novo tubo eppENDORF, seguido de adição de igual volume de clorofórmio. Também seguiu-se a homogeneização e centrifugação a 5000 g por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada para um novo tubo e adicionou-se 0,4 volumes de acetato de amônia 5 M, seguido de 2 volumes de etanol 100%, homogeneização e centrifugação a 5000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” presente no fundo do eppENDORF foi lavado (centrifugação por 5 minutos a 5000 g) com etanol 70% por duas vezes seguidas. Após o último descarte de sobrenadante, colocou-se o “pellet” para secar em temperatura ambiente e quando o mesmo já estava seco adicionou-se 50 µL de TE.

Para a PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *inLA* “forward” e “reverse” (Jaradat, *et al.*, 2001) específicos de *L. monocytogenes*. A mistura de reação para a PCR continha 15,5 µL de água (SIGMA), 0,5 µL de 2 mM de mistura dNTP, 1U (0,2 µL) de Taq DNA polimerase, 2,5 µL de tampão PCR 10 X, 1,5 µL de 50 mM de tampão de cloreto de magnésio e 20 pmol (2,5 µL) do par de oligonucleotídeos. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu na desnaturação (94°C por 1 min.), anelamento do oligonucleotídeo (55°C por 2 minutos), e extensão do oligonucleotídeo (72°C por 1 min.). O DNA amplificado foi analisado em eletroforese com 1 a 2% de gel de agarose corado com 2 µL de brometo de etídio por 1 hora, juntamente com marcador øX174, e sua corrida foi, posteriormente, visualizada em aparelho de luz UV.

Como controle positivo, para visualização do tamanho correto da banda formada, foi utilizada a amostra S7b, que apresentou perfil bioquímico característico de *L. monocytogenes* no método convencional. Como controle positivo para a amostra S7b utilizou-se a amostra padrão obtida da Fundação Osvaldo Cruz (ATCC 7644).

3.3. Análise Estatística

Os dados foram analisados, inicialmente, através de técnicas de estatística descritiva para o cálculo das taxas de frequência de contaminação por *Listeria* sp e *L. monocytogenes* nas carcaças e tonsilas no ensaio convencional e PCR foram determinadas por estatística descritiva. O teste Qui-quadrado foi utilizado para análise das possíveis associações entre

as seguintes variáveis: pontos de controle (etapas de abate) e a presença de *L. monocytogenes* para determinação de pontos críticos de controle, contaminação na carcaça e na tonsila com *L. monocytogenes*; desempenho dos testes microbiológico convencional e PCR e estabelecimento inspecionado e não inspecionado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estabelecimento inspecionado, *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 *Listeria monocytogenes* por pontos de coletas pela técnica convencional no estabelecimento inspecionado (n=30)*.

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

A = imediatamente após o escaldamento/depilação.

B = imediatamente antes da evisceração

C = após a evisceração e serragem das carcaças.

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 pontos de coleta quando se analisou *L. monocytogenes* ($p = 0,288$), nem quando se analisou *Listeria* sp ($p = 0,565$); entretanto a presença de amostras contaminadas com *Listeria* sp foi observada no processo do abate e este resultado indica risco potencial da presença do microrganismo ao final da cadeia de produção, com probabilidade de infecção para o consumidor.

No presente estudo não se observou *L. monocytogenes* após o escaldamento e depilação (ponto A) assim como imediatamente antes da evisceração (ponto B). Este resultado pode ser atribuído ao uso de boas práticas durante a toailete, sendo devidamente aplicada e eficiente para controlar a presença de *L. monocytogenes* até momentos antes da

evisceração, no referido estabelecimento, já que os procedimentos recomendáveis para a toailete são rigorosamente seguidos neste estabelecimento.

A presença de *Listeria* sp e *L. monocytogenes* nos pontos C (evisceração e serragem das carcaças) e no ponto D (refrigeração) indica que a carcaça pode ser contaminada por fezes de animais portadores sadios ou doentes, durante o abate ou de contaminação oriunda do próprio ambiente de abate contaminado com a bactéria em questão. Borch *et al.* (1996) também relataram que *L. monocytogenes* pode ser isolada de fezes suínas e na Dinamarca, esta bactéria foi isolada de 2,2% das amostras de suínos não SPF (livre de patógenos específicos). Os mesmos autores ressaltaram ainda que *L. monocytogenes* pode ser um problema localizado no respectivo matadouro e ser considerada como um indicador de condições insatisfatórias da higiene do ambiente.

Em 1996, nos Estados Unidos, o USDA encontrou uma freqüência de 7,4% de *L. monocytogenes* em amostras de superfície de carcaças suínas resfriadas (McMullen, 2000). McMullen (2000) considerou que o uso das boas práticas de manejo na fazenda ajuda a reduzir as chances dos animais chegarem ao matadouro contaminados com patógenos, inclusive *L. monocytogenes*, que pode estar presente na microbiota intestinal dos suínos, explicando a contaminação das carcaças a partir das fezes dos animais portadores.

A contaminação da carne suína pode se originar de fezes contaminada com *L. monocytogenes* durante o processo de remoção das vísceras e serragem das carcaças, com possibilidade de multiplicação em baixas temperaturas, podendo até mesmo comprometer a higiene do processamento da carne suína, no caso de sua industrialização (Chasseinaux *et al.*, 2002). Esses autores realizaram um estudo na França, no qual várias superfícies de processamento de carnes, inclusive de suínos, foram analisadas a partir de “swabs”. As plantas de processamento de carne suína apresentaram os equipamentos de manipulação da carne contaminados com *L. monocytogenes*, isolada dos equipamentos de recepção da carne suína e nas áreas de processamento da carne.

Como subsídio ao sistema APPCC, pode-se sugerir um melhor monitoramento das fases C e D do processo de abate, enquanto PCCs (pontos críticos de controle) ou não, com relação à presença de *L. monocytogenes*, sendo que estas fases já foram consideradas problemáticas em outras pesquisas (Borch *et al.*, 1996; McMullen, 2000).

Nos estabelecimentos não inspecionados, não houve diferença significativa entre os resultados referentes aos esfregaços de superfície de carcaça e cultivo de fragmentos de tonsilas para *Listeria monocytogenes* ($p = 0,47$), nem para *Listeria sp* ($p = 0,19$), quando se realizou análise partindo de pesquisa por método convencional. Como este comportamento analítico se confirmou no ensaio de PCR ($p = 0,196$), pode-se sugerir que ambas as amostras podem ser adequadas para a pesquisa de *L. monocytogenes* (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência (%) de *Listeria sp* e *Listeria monocytogenes* por carcaça e tonsilas suínas através do exame convencional e PCR nos estabelecimentos não inspecionados (n=30)*.

	% de <i>Listeria sp</i>	% de <i>Listeria monocytogenes</i>	
	Convencional	Convencional	PCR
Carcaça	4 (13,3) ^a	2 (6,66) ^a	18 (60,0) ^b
Tonsila	1 (3,33) ^a	0 (0,0) ^a	13 (43,3) ^b

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

Entre as vantagens e desvantagens dos métodos estudados, ressalta-se que a coleta de tonsila dispensa a interrupção da linha de abate para a realização da pesquisa, o que não ocorre quando a coleta é realizada por esfregaços de superfície das carcaças. Assim, o estabelecimento em estudo não tem seu fluxo de abate afetado durante a execução desta atividade. Por outro lado, os procedimentos de inspeção e de coleta das tonsilas também se constituem em risco de contaminação da carcaça a partir das mãos dos operários e das facas (Borch *et al.*, 1996). Deste modo, o esfregaço de superfície como forma de obtenção de amostras se torna uma opção com menor risco de contaminação da carne, durante o monitoramento de *Listeria sp* num plano APPCC. Além do mais, na pesquisa microbiológica que busca a determinação de pontos críticos de controle num plano APPCC é a coleta de amostras por esfregaço de superfície que permite o acompanhamento de diversos pontos.

A reação da PCR de *L. monocytogenes* em uma amostra de carcaça (S7b), um controle negativo (mistura de reação sem DNA), um controle positivo (ATCC 7644) está ilustrada na figura 3, frente ao marcador molecular øX174.

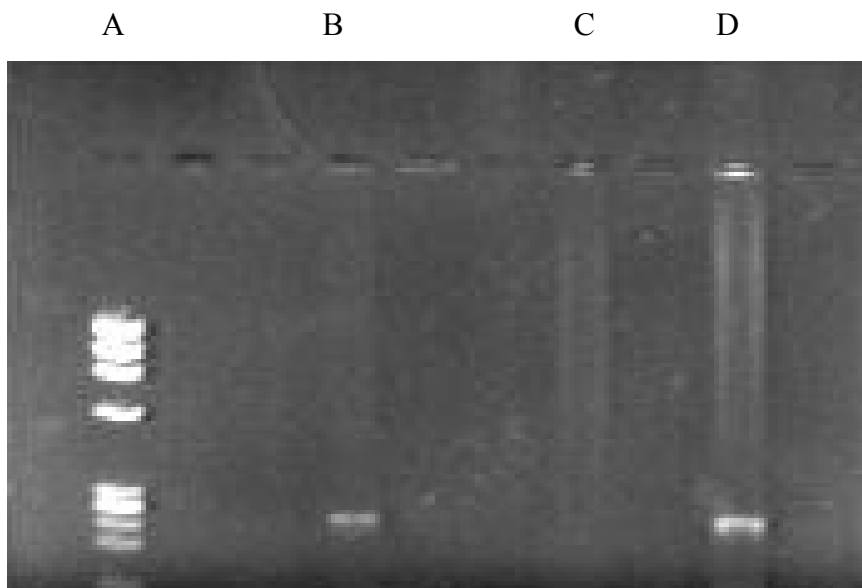


Figura 03 - Resultado da PCR de uma amostra positiva para *L. monocytogenes* (B), controle negativo (C) e controle positivo (D), segundo o marcador molecular (A).

Uma frequência estatisticamente mais elevada da presença de *L. monocytogenes*, que o obtido pela metodologia convencional, pode ser observada no ensaio de PCR (Tabela 2), tanto a partir de esfregaços de superfície de carcaças ($p = 0,00001$), como a partir de fragmentos de tonsila ($p = 0,00005$). Este resultado deve ser analisado com cuidado devido ao fato da técnica ser muito sensível e identificar a presença do DNA bacteriano, mesmo sem a viabilidade da bactéria. Neste caso o patógeno não representaria risco para a Saúde Pública.

Por outro lado, a detecção *L. monocytogenes* pelos métodos convencionais pode subestimar sua presença, caso a bactéria se encontre injuriada, dificultando seu isolamento (Williams e Golden, 2001). Sendo assim, o ensaio de PCR torna-se uma técnica importante para a detecção do microrganismo.

A pesquisa microbiológica de *L. monocytogenes* demanda tempo e pode chegar a 14 dias para a confirmação do microrganismo, enquanto que o ensaio de PCR pode ser realizado num prazo de 24 horas. Diante de um surto de toxinfecção alimentar em que as características da listeriose estejam presentes, a pesquisa convencional torna-se demorada.

O custo para realização das análises considerando-se um laboratório montado, contando-se apenas o custo com reagentes e meios de cultura, encontra-se em torno de US\$

7,38 na pesquisa convencional. Neste contexto, o ensaio de PCR apresenta-se como uma boa alternativa na identificação do agente em questão, mostrando-se uma técnica mais econômica, quanto ao consumo de reagentes e meios de cultura, na pesquisa do referido agente, com custo em torno de U\$ 2,09.

Quando se compararam o estabelecimento inspecionado com os não inspecionados em relação à frequência de *L. monocytogenes*, não se observou diferença significativa, com *L. monocytogenes* ($p = 1,00$) e *Listeria* sp ($p = 0,66$). Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os diferentes tipos de estabelecimentos, observou-se uma frequência maior no estabelecimento não inspecionado (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência (%) de *Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp por estabelecimentos inspecionado e não inspecionado.

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> sp
Inspecionado	1 (3,33) ^a	2 (6,66) ^a
Não inspecionado	2 (6,66) ^a	4 (13,33) ^a

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

Como a dose mínima infectante de *L. monocytogenes* não é conhecida, e parece ser da ordem de 10^3 UFC (Germano & Germano, 2001), mais baixa que a maioria das bactérias patogênicas da carne, a presença do referido microrganismo na carne suína *in natura* deveria gerar preocupação por parte dos serviços de saúde pública e das indústrias alimentícias, considerando a possibilidade existente do microrganismo causar doença na população consumidora.

A pesquisa de *L. monocytogenes* em estabelecimentos de abate de suínos brasileiros merece maior atenção das autoridades de Saúde Pública e das instituições de ensino e pesquisa visando o bem estar da população e a qualidade microbiológica dos alimentos produzidos neste país.

Considerando a incipiente investigação nacional de *Listeria* sp no processo de abate de suínos, os resultados desta pesquisa alertam para a demanda de novas investigações dessa natureza, incluindo a avaliação de riscos, para estabelecer uma condição sanitária mais clara com relação aos possíveis riscos de transmissão da listeriose ao ser humano a partir do processo de abate de suínos, dada a grande diversidade de padrões higiênico-sanitários de abate existente no Brasil.

5. CONCLUSÕES

Listeria monocytogenes é um perigo microbiológico que pode ocorrer ao longo do processo de abate de suínos. A pesquisa de *L. monocytogenes* em estabelecimentos durante o processo de abate permite a caracterização do referido microrganismo como patógeno a ser controlado e a caracterização de pontos críticos de controle para o mesmo num plano APPCC.

Existe uma evidência de *L. monocytogenes* e *Listeria* sp após a evisceração e serragem das carcaças e no resfriamento, caracterizando uma provável contaminação da carcaça que pode ser a partir de fezes suínas contaminadas ou a partir do ambiente contaminado, com possível multiplicação do microrganismo na etapa de refrigeração.

A pesquisa de *L. monocytogenes* no abate após a evisceração e serragem das carcaças pode ser realizada por coleta de tonsila como alternativa ao esfregaço de superfície da carcaça, evitando-se maiores interrupções no processo de abate, quando se deseja caracterizar a presença do microrganismo no ambiente de abate. Por outro lado, a pesquisa de *L. monocytogenes* por coleta de “swabs” de carcaça também auxilia na determinação de Pontos Críticos de Controle no sistema APPCC, quando as contaminações a partir de tonsilas forem frequentes nas operações de coleta de amostras.

A técnica de PCR mostrou-se mais sensível para detectar *L. monocytogenes*, de resultado rápido e mais viável economicamente em se tratando de custos com reagentes, podendo ser empregada em atividades de monitoramento da *L. monocytogenes* num plano APPCC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N. & SZYFRES, B. Listeriosis. In: *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. Pan American Health Organization, second edition, p.105-111, 1987.
- ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C.; RODRICK, G. E. Listeria monocytogenes: importância e distribuição nos alimentos. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n.64, p.19-21, 1999.
- BERENDS, B. R., KNAPEN, F. van, MOSSEL, D. A. A., BURT, S. A., SNIJDERS, J. M. A. Impact on human health of Salmonella spp. on in pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *International Journal of Food Microbiology*, v.44, n.3, p.219-229, 1998.
- BERENDS, B. R., URLINGS, H. A. P., SNIJDERS, J. M. A., KNAPEN, F. van. Identification and qualification of risk factors regarding Salmonella spp. on pork carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, v.36, p.199-206, 1997.
- BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, n.30, p.9-25, junho, 1996.
- BRAKETT, R. E. Presence and persistence of Listeria monocytogenes in food and water. *Food Technology*, v.42, n.4, p.162-164, 1988.

- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução - RDC, n.12, de 2 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União de 10 de janeiro de 2001.
- BRASIL, leis, decretos, etc. Portaria nº 46 de 10/02/98. Manual genérico de procedimento para APPCC em indústrias de produtos de origem animal. Diário Oficial da União. Brasília, Ministério da Agricultura e Abastecimento, seção 1, p.24-28, 1998.
- BYUNA, S-K, JUNGA, S.C., YOON, H.S. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. *International Journal of Food Microbiology*, v.69, n.3, p.227-235, 2001.
- CARR, M. A.; THOMPSON, L. D.; MILLER, M. F.; RAMSEY, C. B.; KASTER, C. S. Chilling and trimming effects on the microbial populations of carcasses. *Journal of Food Protection*, v.61, n.4, p.487-489, 1998.
- 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*, n.210, p.271-275, 2002.
- CORRÊA, W.M., CORRÊA, C.N.M. *Enfermidades Infeciosas dos Mamíferos Domésticos*. Parte II: enfermidades por bactérias - listeriose. Rio de Janeiro, Editora Médica e Científica Ltda., 1992, p.367-373.
- DEMARTINIS, E. C. P., FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. *Elsevier Science B. V.*, 1998.
- DESTRO, M. T. & SERRANO, A. M. *Listeria* sp em alimentos. Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia Alimentar, v.24, n.1/2, p.13-37, 1990.
- DESTRO, M.T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. *International Journal of Food Microbiology*, v.62, n3, p.191-196, 2000.
- ELEY, A.R. *Microbial food poisoning*. London, Chapman & Hall, 1994. 191p.
- FARBER, J. M. & PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, v.55, n.3, p.476-511, 1991.

- GARCIA, C. A. *Listeria sp em afluentes e efluentes de matadouros frigoríficos de bovinos*. São Paulo, 1993, 258 p. [Tese de Doutorado-Fac. Méd. Vet. Zoot. da USP].
- GERMANO, P.M.L., GERMANO, M.I.S. Qualidade das matérias primas. Doenças transmitidas por alimentos. Treinamento de recursos humanos. In: GERMANO, P.M.L., GERMANO. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*, volume I. São Paulo, SP, Varela, 2001. 629p.
- HOFER, E. Três décadas de experiência sobre *Listeria* no Brasil. In: MERCADANTE, A.Z.; BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.; PEREIRA, J.L.; PASTORE, G.M. *Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas*. Campinas, SP: Faculdade de Engenharia de Alimentos/Universidade Estadual de Campinas, volume II, Capítulo 33, p.111-115. 2001. 272p.
- HOLKO, I.; URBANOVÁ, J.; KANTIKOVÁ, M.; PÁSTOROVÁ, K.; KMET, V. PCR detection in Milk and Milk Products and Differentiation of Suspect Isolates. *ACTA VET.BRNO*, v.71, p.125-131, 2002.
- JARADAT, Z. W.; SCHUTZE, G. E.; BHUNIA, A. K..Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meta products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR análise of virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*, n.76, p.1-10, 2001.
- JEMMI, T., PAK, SON-IL, SALMAN, MO D. Prevalence and risk for contamination with *Listeria monocytogenes* of imported and exported meat and fish products in Switzerland, 1992 - 2000. *Preventive Veterinary Medicine*, n.54, p.25-36, 2002.
- 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.
- LECLERC, V., DUFOUR, B., LOMBARD, B., GAUCHARD, F., GARIN-BASTUJI, B., SLAVAT, G., BRISABOIS, A., POUMEYROL, M., DE BUYSER, M-L, GNAUNOU-BESSE, N., LAHELLEE, C. Pathogens in meat and milk products:

- surveillance and impact on human health in France. *Livestock Production Science*, n.76, p.195-202, 2002.
- 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. *Revista Higiene Alimentar*, v.15, n.80/81, p.39-48, 2001.
- LOVETT, J. & TWEDT, R. M. *Listeria*. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Bacterial associated with food borne diseases. *Food Technology*, n.42, p.188-191, 1988.
- LUCHANSKY, J. B. and DOUGLE, M. P. *Behaviour and control of Listeria monocytogenes in meats*. Proc. *Listeria et Sécurité Alimentaire*, ASEPT Editeur, Laval Cedex, France, 1991.
- LUNDÉN, J.; AUTIO, T.; MARKKULA, A.; HELLSTRÖM, S.; KORKEALA, H. Adaptative and cross-adaptative responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, v.2570, 2002. Obtido via base de dados GOOGLE.2002. Capturado em out.2002. Disponível no site <http://www.elsevier.com>.
- MCLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 1999.
- MCMULLEN, L.M. Intervention Strategies to Improve the Safety of Pork. *Advances in Pork Production*, n.11, p.165-173, 2000.
- MEYER-BROSETA, S., DIOT, A., BASTIAN, S., RIVIÉRE, J., CERF, O. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, n.2447, p.1-15, 2002.
- NORTON, D-M., BATT, C.A. Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. *Applied and environmental microbiology*, v.65, n.5, p.2122-2127, 1999.
- PRENTICE, G.A. *Listeria monocytogenes*. In: *International Dairy Federation. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk*. Brussels-Belgium, Square Vergote, 1994. 215p.

- ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. *Food control*, v.7, n.4/5, p.195-202, 1996.
- SCHLECH, W. F. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, v.42, n.4, p.176-178, 1988.
- 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.
- SHANK, F. R.; ELLIOT, E. L.; WACHSMUTH, I. K.; LOSIKOFF, M. E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. Informativo disponível em *ScienceDirect*, 2001. Obtido via base de dados *GOOGLE.2000*. Capturado em set. 2001. Online. Disponível no site <http://www.elsevier.com>.
- SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical points and the environment of Minas Frescal cheese processing. Obtido via base de dados *GOOGLE.2000*. Capturado em set. 2001. Online. Disponível no site <http://www.elsevier.com>.
- SILVA, M.C.D., VILARDI, T.C.C., TIBANA, A. Avaliação de métodos para a detecção de *Listeria* em queijos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, n.2, Campinas, Maio/Jul. 1998.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo, Varela, p.133-139, 1997.
- SMULDERS, F. J. M.; GREER, G. G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*, v.44, p.149-169, novembro 1998.
- SORIANO, J.M., RICO, H., MOLTÓ, J.C., MAÑES, J. Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. *Food Control*, n.13, p.253-261, 2002.
- SÖRQUIST, S. Heat resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl Bact.*, n.76, p.383-388, 1994.

- TOBIA, M.B.; MENGONI, G.B.; PELLON, H.S. *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp en productos termoprocados. *Revista Argentina de Microbiologia*, v.29, 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*, v.210, p.25-31, 2002.
- UBOLDI EIROA, M. N. *Listeria monocytogenes: um problema em leite e produtos lácteos*. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.13, n.155, p.19-23, 1988.
- UNESP - BOTUCATU. O abate clandestino. Obtido via base de dados Altavista, em nov. de 2003. Disponível no site www.fca.unesp.br/departam/Gestão/tec-compl.htm.
- WATKINS, J. & SLEATH, K. P. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge, and river water. *J. Appl Bact.*, 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*, v.64, n.3, p.379-386, 2001.

7. APÊNDICES

7.1. APÊNDICE 1 - Características bioquímicas

Características bioquímicas de *Listeria monocytogenes* e distribuição dos isolados de *Listeria monocytogenes* e *Listeria sp* em suínos inspecionados e não inspecionados:

	Catalase	Caldo nitrato	β-hemólise	Teste CAMP		Fermentação do carboidrato			Motilidade	GRAM
				<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	Rhamnose	Xylose	Manitol		
<i>Listeria Monocytogenes</i> *	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
C20 a	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
C20 b	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
C21 a	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
C21 b	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
D19 a	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
D19 b	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
S2 a	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
S2 b	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
S7 a	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
S7 b	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
S16	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
S22 a	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
S22 b	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
T16	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+

D e C: pontos de coleta no matadouro inspecionado.

a e b: diferentes colônias de um mesmo animal.

S: isolados de swab no matadouro não inspecionado.

T: isolados de tonsila no matadouro não inspecionado.

*FONTE: PRENTICE (1994).

7.2. APÊNDICE 2 - Fluxograma de matadouro-frigorífico de suínos inspecionado.

Área suja:

Insensibilização (eletroanestesia)



Sangria



Pendura



Escaldamento



Depilação



Primeiro chicote seco (toalete)



Chamuscamento (toalete)



Toaletes alta e baixa



Aspersão com água clorada (1,5 - 2,0 ppm)



Área limpa:

Oclusão do reto (pré-evisceração)



Abertura de papada abdominal e torácica



Evisceração



Serragem das carcaças



Inspeção final



Retirada de cabeça, pés e cauda



Aspersão com água clorada (1,5 - 2,0 ppm)



Sanitização (ácido láctico a 0,85% - 3,00%)



Refrigeração (24 - 48 horas)



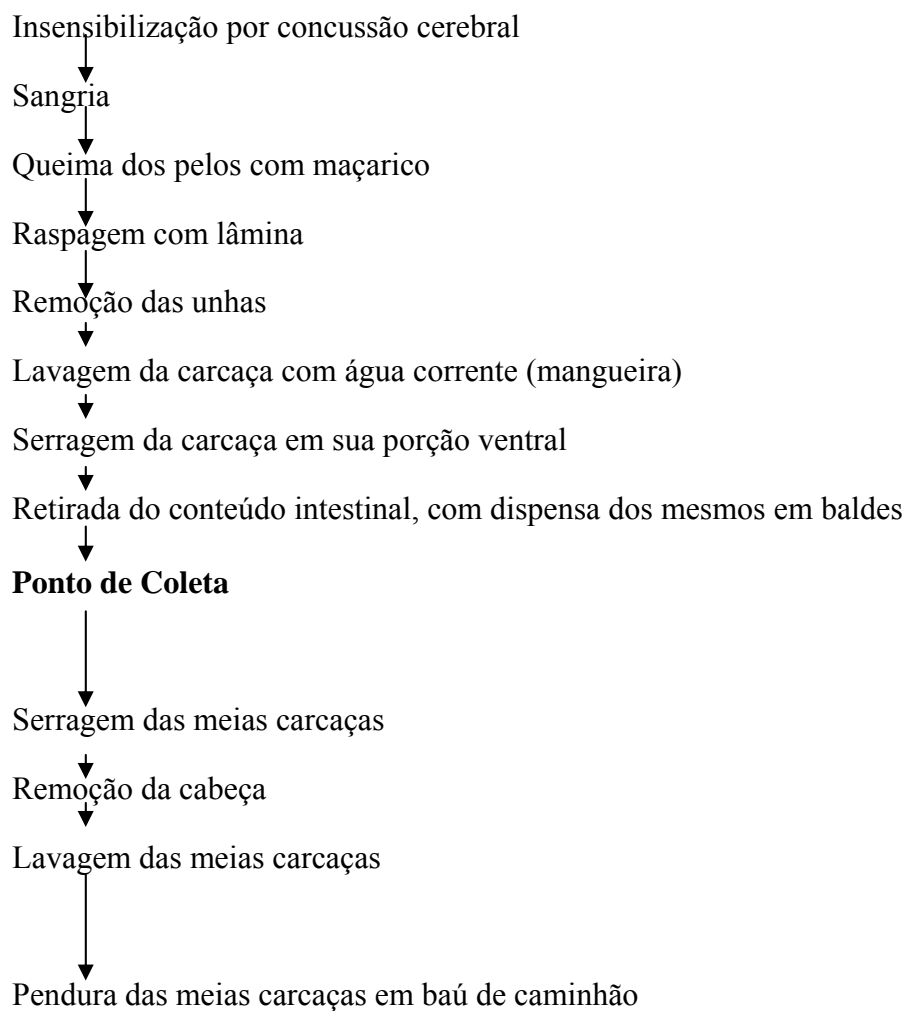
Ponto A

Ponto B

Ponto C

Ponto D

7.3. APÊNDICE 3 - Fluxograma de matadouro de suínos não inspecionados.



7.4. APÊNDICE 4 - Análise de custo

Análise de custo dos reagentes consumidos na pesquisa microbiológica e PCR de *Listeria monocytogenes*:

Orçamento de Reagentes utilizados na pesquisa microbiológica (23/11/2003)

Reagentes da pesquisa microbiológica:	R\$	U\$
Oxford meio base	1,34	0,473498
UVM modif. Lis. Enrich. Broth	8,80	3,109541
Fraser broth	0,58	0,204947
Caldo tripticaseína e soja	2,36	0,833922
Extrato de levedura	0,26	0,091873
Ágar nutriente	1,62	0,572438
Ramnose	0,76	0,268551
Xilose	0,08	0,028269
Manitol	0,03	0,010601
Esculina	1,58	0,558304
Dextrose	0,001	0,000353
Maltose	0,06	0,021201
Ágar púrpura base	2,25	0,795053
Caldo nitrato	0,34	0,120141
Ágar sangue base	0,85	0,300353
TOTAL	20,911	7,389046

Orçamento de Reagentes na pesquisa PCR (23/11/2003)

Reagentes utilizados na extração do DNA e PCR	R\$	U\$
TE	0,020518	0,00725
Tampão de extração	1,42632	0,504
Proteinase K	0,996726	0,3522
Fenol	0,048898	0,017279
Trizol	2,534265	0,8955
Clorofórmio	0,1188	0,041979
Acetato de amônia 5M	0,000601	0,000212
Álcool etílico absoluto	0,014784	0,005224
Corante	0,010222	0,003612
Agarose	0,095331	0,033686
Brometo de etídeo	0,001146	0,000405
Primers <i>InlA</i> forward e reverse	0,05	0,017668
Buffer 10X	0,0056	0,001979
DNTP	0,140028	0,04948
Taq DNA polimerase	0,363598	0,12848
Cloreto de magnésio	0,0965	0,034099
TOTAL	5,923337	2,093052