

# EFICIÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO EM DUPLO ESTÁGIO REALIZADO NOS CALDOS UVM E FRASER E DESEMPENHO DOS ÁGARES LPM E LSAB-CAN PARA A DETECÇÃO DE *Listeria* spp. EM CARNE DE FRANGO NATURALMENTE CONTAMINADA<sup>1</sup>

Iolanda Aparecida Nunes,<sup>2</sup> Oswaldo Durival Rossi Júnior,<sup>2</sup>  
Albenones José de Mesquita<sup>2</sup> e César Augusto Garcia<sup>2</sup>

## ABSTRACT

Efficiency of Double Steps Enrichment in the UVM and Fraser Brothes and Performance of LPM and LSAB-CAN Agars to Detection of *Listeria* spp. in Naturally Contaminated Chicken Meat

It was determined the performance of two selective broths and two agars to isolate *Listeria* from chicken meat naturally contaminated, acquired in the supermarkets of Goiânia-Goiás, in the period between January and June 1992. Methodology of isolation involved the utilization of two-stage selective enrichment in the University of Vermont and Fraser broths and plating in lithium chloride-phenyletanol-moxalactam agar and the *Listeria* selective agar base supplemented with cicloheximide, acriflavine and nalidixic acid. Incubation was done at 30°C for 48 hours. Cultures of secondary enrichment broth were inoculated in duplicated plates with and without previous treatment with a 0,25% potassium hydroxide solution during one minute, while the plates from primary enrichment broth were inoculated only with treated cultures. Primary and secondary selective broths showed comparable efficiency at the statistic point of view ( $Z = -1,7393 < -1,96$ ), identifying 90,28% and 97,22% of all positive samples of this experiment, respectively. Using the lithium chloride-phenyletanol-moxalactam agar and the *Listeria* selective agar base supplemented with cicloheximide, acriflavine and nalidixic acid were detected 98,61% and 54,17% of the positive samples. These differences were significant at statistic view. The treatment of broths with 0,25% potassium hydroxide showed a little reduction in the number of positive samples detected.

KEY WORDS: *Listeria*, enrichment broth, chicken meat.

## RESUMO

No presente trabalho, avaliou-se o desempenho de dois caldos e dois ágaros seletivos para o isolamento de *Listeria* a partir de carne de frango naturalmente contaminada, adquirida no comércio varejista de Goiânia-GO., no período de janeiro a junho de 1992. A metodologia de isolamento e identificação de *Listeria* adotada envolveu a utilização de enriquecimento seletivo em estágio duplo nos caldos "University of Vermont" e Fraser e plaqueamento no ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam e no ágar base seletivo para

<sup>1</sup> Entregue para publicação em agosto de 1995.

<sup>2</sup> Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. C.P. 131. CEP 74.001-970. Goiânia-GO.

*Listeria*, suplementado com cicloheximide, acriflavina e ácido nalidíxico. Verificou-se o desempenho dos caldos e enriquecimento para *Listeria* (caldos UVM e Fraser), associados à passagem da cultura por uma solução de hidróxido de potássio a 0,25%, constatando-se que os mesmos se equivaleram estatisticamente ( $Z = -1,7393 < 1,96$ ). Por outro lado, o ágar LPM apresentou destacada superioridade frente ao ágar LSAB-CAN em relação ao total de amostras analisadas ( $Z = 7,368 > Z_{0,975}$ ). O tratamento da cultura com a solução de hidróxido de potássio a 0,25% mostrou ligeira inibição, contribuindo para redução no número de amostras positivas detectadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Listeria*, caldo de enriquecimento, carne de frango

## INTRODUÇÃO

O isolamento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos frequentemente apresenta-se problemático, estando os métodos culturais convencionais de diagnóstico em constante desenvolvimento (Donnelly 1988, Cassiday & Brackett 1989).

Diante dos insucessos apresentados pelos procedimentos de plaqueamento direto, decorrentes da elevada competição por outros gêneros bacterianos muitas vezes presentes nos alimentos, muitos autores recomendam a utilização do enriquecimento prévio das amostras (Martin et al. 1984, Doyle & Schoeni 1986, Lee & McClain 1986, Loessner et al. 1988, Curtis et al. 1989).

Até o momento, não foram adotados, no Brasil, métodos oficiais padronizados para o isolamento e a identificação de *Listeria* spp. a partir de alimentos, e a multiplicidade de meios disponíveis para este fim indica que não foi ainda desenvolvido um meio satisfatório para a sua detecção. Desta forma, existe uma grande variedade de trabalhos descritos na literatura internacional e alguns no Brasil, avaliando os diferentes meios seletivos para o isolamento e a identificação dessa bactéria em alimentos (Dominguez et al. 1988, Golden et al. 1988a e b, Loessner et al. 1988, Buchanan et al. 1989, Heisik et al. 1989, Jatisatien & Busse 1989, Destro 1990, Mesquita 1991, Serafini 1992).

O presente trabalho tem como objetivos comparar a eficiência dos enriquecimentos primário e secundário realizados nos caldos "University of Vermont" (UVM) e Fraser, respectivamente, bem como a do ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM) e ágar base seletivo para *Listeria*, suplementado com cicloheximide, acriflavina e ácido nalidíxico (LSAB-CAN), para o isolamento de *Listeria* spp. em carne de frango naturalmente contaminada.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro a maio de 1992 foram analisadas 80 amostras de carnes de frango colhidas no varejo, em Goiânia-GO. Foram adquiridos 300 gramas dos produtos em suas embalagens originais de acordo com a disponibilidade do mercado. Após as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo triturado e conduzidas ao Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Escola de Veterinária da UFG.

Adotou-se metodologia proposta por McClain & Lee (1989) para o isolamento e identificação de *L. monocytogenes* a partir de carne processada e produtos avícolas.

Nas etapas de enriquecimento primário e secundário foram empregados os caldos "University of Vermont" (UVM) (McClain & Lee 1988) e Fraser (Fraser & Sperber, 1988), respectivamente.

Para plaqueamento seletivo foram utilizados ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM) (Lee & McClain 1986) e o ágar base seletivo para *Listeria*, de Curtis *et al.* (1989), suplementado com cicloheximide, acriflavina e ácido nalidixico (ágar LSAB-CAN), nas concentrações recomendadas por Mesquita (1991). Nesta fase foram adotadas duas etapas: uma de semeadura direta nos meios seletivos e a outra após o tratamento com solução de hidróxido de potássio a 0,25%. Esse procedimento teve por finalidade eliminar parte da microbiota contaminante.

A incubação foi realizada a 30°C, em incubadora para B.O.D., durante 48 horas.

As colônias consideradas suspeitas de pertencerem ao gênero *Listeria* foram purificadas em ágar soja-trypticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE). A confirmação bioquímica das mesmas foi feita segundo a recomendação de Lovett (1988) e aquelas que apresentaram características fenotípicas compatíveis com as espécies do gênero foram encaminhadas à Fundação Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, para a caracterização sorológica.

Na análise estatística dos resultados empregou-se o teste para comparação entre duas proporções, segundo Snedcor & Cochran 1980.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o desempenho dos caldos UVM e Fraser, empregados para o enriquecimento em duplo estágio de *Listeria* a partir de amostras de carne de frango, bem como do ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM) e do ágar base seletivo para *Listeria*, suplementado com cicloheximide, acriflavina e ácido nalidixico (LSAB-CAN).

Depreende-se, pelos resultados, que o desempenho apresentado pelos dois caldos foi semelhante, embora o caldo de enriquecimento secundário (caldo Fraser) tenha sido ligeiramente superior, permitindo a detecção de um maior número de amostras positivas. A utilização somente do enriquecimento primário (caldo UVM) foi responsável pela identificação de 90,28% (65/72) das amostras positivas, enquanto o enriquecimento secundário permitiu detectar 97,22% (70/72). Essa diferença não apresentou significado estatístico ( $Z = -1,7393 < 1,96$ ).

Esses resultados estão em conformidade com os relatados por Lammerding & Doyle (1989), Fernandez-Garayzabal & Genigeorgis (1990) e Mesquita (1991), que conduziram trabalhos comparando a eficiência do enriquecimento em duplo estágio. Os trabalhos desenvolvidos por esses autores, embora em sua maioria não utilizassem os mesmos produtos e caldos empregados no presente estudo, apresentaram unanimidade em relação à equivalência entre os enriquecimentos primário e secundário, com ligeira superioridade deste último. Os citados trabalhos destacam também a necessidade da associação dos caldos para que se obtenha eficiência máxima no isolamento de *Listeria* spp. Contrastando com os resultados acima referidos, URL *et al.* (1989), citado por Serafini (1992),

observaram melhor desempenho do primário, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas.

O desempenho superior apresentado pelo caldo Fraser pode ser explicado por sua maior seletividade e pela prévia passagem pelo caldo UVM que, por possuir menor seletividade, permite o revigoramento das células subletalmente injuriadas, conforme observado por Bailey *et al.* (1990).

Apesar de não ter sido realizada a enumeração de listérias neste trabalho, aparentemente a boa eficiência do caldo UVM pode ter sido decorrente de um pronunciado nível de contaminação inicial das amostras por *Listeria spp.*, permitindo a recuperação do microrganismo já a partir do enriquecimento primário.

Pelos dados da Tabela 1 ainda se evidencia que a utilização dos ágar LPM e LSAB-CAN foi responsável pela detecção de 98,60% (71/72) e 54,10% (39/72), respectivamente, das amostras positivas obtidas. A diferença entre estes resultados mostrou-se estatisticamente significativa ( $Z = 7,368 > Z_{0,975}$ ), confirmando a elevada superioridade do LPM frente ao LSAB-CAN.

Apesar de a literatura sobre avaliação de metodologias e meios seletivos de plaqueamento para o isolamento e a identificação de *L.monocytogenes* em produtos de origem animal ser extremamente abundante, a comparação entre resultados é bastante dificultada devido à heterogeneidade de procedimentos adotada pelos pesquisadores.

O ágar LPM tem sido descrito pela grande maioria dos autores como um dos ágar de maior eficiência para o isolamento de *Listeria* em produtos cárneos e lácteos, em virtude de sua alta seletividade e pequeno efeito sobre células injuriadas. Nesse sentido podem ser citados os trabalhos desenvolvidos por Lee & McClain (1986), Datta *et al.* (1988), Loessner *et al.* (1988), McClain & Lee (1988), Brackett & Beuchat (1989), Bailey *et al.* (1989), Hitchins & Tran (1990) e Mesquita (1991).

O baixo desempenho apresentado pelo ágar LSAB-CAN está em desacordo com os resultados obtidos por Mesquita (1991) que, ao utilizá-lo em associação com o ágar LPM para o isolamento de *Listeria spp.* a partir de carne bovina moída, obteve eficiência bastante próxima entre ambos, com ligeira superioridade do LSAB-CAN.

Tabela 1: Distribuição das amostras de carne de frango positivas para *Listeria spp.*, segundo o estágio de enriquecimento seletivo utilizado e o tipo do produto.

Meios de cultura	Nº amostras <sup>1</sup>	%
Caldo UVM (enriquecimento primário)	65/72	90,28
Caldo Fraser (enriquecimento secundário)	70/72	97,22
Ágar LPM	71/72	98,61
Ágar LSAB-CAN	39/72	54,17

<sup>1</sup> - Número de amostras positivas obtidas com o uso do enriquecimento ou ágar/total de amostras analisadas

Na literatura consultada não constam outros trabalhos em que o ágar LSAB-CAN tenha sido utilizado. Ressalta-se, no entanto, que, apesar de no presente estudo terem sido utilizados outros inibidores que não os presentes na formulação original, as concentrações adotadas foram as mesmas recomendadas em outros meios para o isolamento de *Listeria*, conforme descrito por Mesquita (1991). Isto leva à suposição de que o tipo de produto analisado no presente trabalho pode ter influenciado os resultados obtidos com a utilização deste ágar. Por outro lado, estudos posteriores parecem ser necessários para o esclarecimento desse ponto.

Os dados constantes da Tabela 2 relacionam-se com a detecção de *Listeria* spp. segundo os procedimentos da metodologia adotada. Pode-se verificar que, partindo-se do caldo de enriquecimento primário associado à passagem pela solução alcalina e utilizando-se o ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam como meio seletivo (UVM/KOH/LPM), foi possível detectar 81,11% das amostras positivas (62/72). Este índice passou a 87,50% (63/72) quando foi empregado o caldo de enriquecimento secundário associado à passagem pela solução de KOH a 0,25% (FRASER/KOH/LPM) e a 91,67% (66/72) quando o tratamento pela solução alcalina foi suprimido (FRASER/LPM). As diferenças entre tais resultados não foram significativas estatisticamente.

Conforme os dados mostrados ainda na Tabela 2, ao se fazer uso do caldo de enriquecimento primário em associação com o tratamento pela solução de KOH e tendo-se o ágar base seletivo para *Listeria* suplementado com cicloheximide, acriflavina e ácido nalidíxico como meio seletivo (UVM/KOH/LSAB-CAN), obtiveram-se 33,33% das amostras positivas (24/72). No caso do uso do caldo Fraser associado ao tratamento com solução de KOH (FRASER/KOH/LSAB-CAN) este valor passou para 36,11% (26/72) e para 41,67% (30/72) quando da omissão deste tratamento (FRASER/LSAB-CAN).

Pela análise desses dados, pode-se perceber, ainda, que a passagem pela solução de KOH a 0,25%, durante um minuto, concorreu para um ligeiro decréscimo no número de amostras positivas detectadas quando esse tratamento foi associado ao caldo Fraser, embora sem significado estatístico. Desta forma, obtiveram-se valores de  $Z = 0,6849 < Z_{0,975} = 1,96$  para FRASER/LSAB-CAN e FRASER/KOH/LSAB-CAN;  $Z = 0,8203 < Z_{0,975} = 1,96$ , para FRASER/LPM e FRASER/K/LPM.

O efeito inibidor para *Listeria* spp. apresentado no tratamento pela solução de KOH, constatado no presente trabalho, está em desacordo com os resultados de Lovett *et al.* (1987), Lovett (1988), Pini & Gilbert (1988) e Destro (1990), que relatam o favorecimento da recuperação de bactérias desse gênero quando a cultura era tratada com essa solução. De forma semelhante, discordam do trabalho de Serafini (1992), que observou que tal tratamento não exercia os efeitos que lhes são atribuídos. Quando são comparadas as concentrações utilizadas, verifica-se que os resultados são bastante contrastantes entre os autores, aparentemente não mantendo correlação com as concentrações empregadas. Embora a concentração aqui adotada tenha sido inferior às utilizadas nos trabalhos acima citados, verificou-se um efeito negativo sobre a bactéria. Provavelmente tal resultado seja decorrente do elevado número de colônias identificadas no presente trabalho.

Desta forma, observando ainda a Tabela 2, nota-se que, para a recuperação de todas as amostras positivas obtidas neste trabalho, foi indispensável a associação entre os passos que compuseram a metodologia de isolamento e identificação. Conforme os valores constantes das Tabelas 1 e 2, outro fator importante verificado foi a inadequação do ágar LSAB-CAN para o isolamento de *Listeria* spp. a partir de carnes cruas de frango.

Tabela 2: Detecção de *Listeria* spp. em carne de frango, segundo o procedimento de isolamento e o tipo de amostra.

Procedimento <sup>1</sup>	Nº amostras <sup>2</sup>	%
UVM/KOH/LSAB-CAN	24/72	33,33
UVM/KOH/LPM	62/72	86,11
FRASER/LSAB-CAN	30/72	41,67
FRASER/KOH/LSAB-CAN	26/72	36,11
FRASER/LPM	66/72	91,67
FRASER/KOH/LPM	63/72	87,50

1 UVM/KOH/LSAB-CAN: caldo UVM, com tratamento da cultura com solução de KOH a 0,25%, utilizando-se o ágar LSAB-CAN para plaqueamento.

UVM/KOH/LPM: caldo UVM, com tratamento da cultura com solução de KOH a 0,25%, utilizando-se o ágar LPM para plaqueamento.

FRASER/LSAB-CAN: caldo Fraser, sem tratamento da cultura por solução de KOH a 0,25%, utilizando-se o ágar LSAB-CAN para plaqueamento.

FRASER/KOH/LSAB-CAN: caldo Fraser, com tratamento da cultura com solução de KOH a 0,25%, utilizando-se o ágar LSAB-CAN para plaqueamento.

FRASER/LPM: caldo Fraser, sem tratamento da cultura com solução de KOH a 0,25%, utilizando-se o ágar LPM para plaqueamento.

FRASER/KOH/LPM: caldo Fraser, com tratamento da cultura com solução de KOH a 0,25%, utilizando-se o ágar LPM para plaqueamento.

2 número de amostras positivas recuperadas pelo procedimento/total de amostras positivas

## CONCLUSÕES

Os caldos de enriquecimento primário (caldo UVM) e secundário (caldo Fraser), associados ou não à passagem prévia ao plaqueamento pela solução de KOH a 0,25%, apresentaram desempenho estatisticamente equivalente considerando-se as 72 amostras positivas, embora o enriquecimento secundário tenha permitido a recuperação de um maior número de amostras positivas.

O ágar LPM mostrou-se mais eficiente que o ágar LSAB-CAN para o isolamento de *Listeria* spp. a partir de carne de frango.

O tratamento da cultura em caldo pela solução de KOH a 0,25% concorreu para um ligeiro decréscimo no número de amostras positivas recuperadas, embora essa redução não tenha apresentado valor estatístico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bailey, J. S., D. L. Fletcher & N. A. 1989.** Recovery and serotype distribution of *L. monocytogenes* from broiler chickens in the southeastern United States. *J. Food Prot.*, 52: 148-150.
- Brackett, R. E. & L. R. Beuchat. 1989.** Methods and media to the isolation and cultivation of *L. monocytogenes* from various food. *Int. J. Food Microbiol.*, 8: 219-223.
- Buchanan, R. L. 1989.** Comparison of lithium-chloride-phenylethanol-moxalactam and modified Vogel-Johnson agars for detection of *Listeria* spp. in retail level meats, poultry and seafood. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 599-603.
- Cassiday, P. K. & R. E. Brackett . 1989.** Methods and media to isolate *L. monocytogenes*: a review. *J. Food Prot.*, 52: 207-217.
- Curtis, G. D. W. 1989.** Selective differential medium for the isolation of *L. monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8: 95-8.
- Datta, A. B., B. A. Wentz & E. W. Hill 1987.** Detection of hemolytic *L. monocytogenes* by using DNA colony hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2256-59.
- Destro, M. T. 1990.** Isolamento de *Listeria* spp. e estudo de sua ocorrência em carnes, leite e derivados. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 73 p.
- Dominguez, L. 1988.** Assessment of different selective agar media for enumeration and isolation of *Listeria* from dairy products. *J. Dairy Res.*, 55: 579-83.
- Donnelly, C. W. 1988.** Historical perspectives on methodology to detect *L. monocytogenes*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 7: 644-6.
- Doyle, M. P. & J. L. Schoeni. 1986.** Selective-enrichment procedure for isolation of *L. monocytogenes* from fecal and biologic specimens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 1127-9.
- Fernandez-Garayzabal, J. & C. Genigeorgis. 1990.** Quantitative evaluation of three selective enrichment broths and agars used in recovering *Listeria* microorganisms. *J. Food Prot.*, 53 (2 ): 105-10.
- Fraser, J. A. & H. W. Sperber. 1988.** Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *J. Food Prot.*, 51: 762-5.
- Golden, D. A., L. R. Beuchat & R. E. Brackett . 1988 b.** Evaluation of selective direct plating media for their suitability to recover uninjured, heat-injured and freeze-injured *L. monocytogenes* from foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 54, p. 1451-1456, 1988a. Inactivation and injury of *L. monocytogenes* as affected by heating and freezing. *Food Microbiol.*, 5: 17-23.
- Heisick, J. E. 1989.** Comparison of four procedures to detect *Listeria* spp. in foods. *J. Food Prot.*, 52: 154-7.
- Hitchins, A. D. & T. Tran. 1990.** Initial cell concentration and selective media effects on the isolation of *L. monocytogenes* from enrichment cultures of inoculated foods. *J. Food Prot.*, 53: 502-4.

- Jatisatiennr, C. & M. Busse. 1989.** Comparison of selective media for *Listeria*. In Modern Microbiological Methods for dairy products. International Dairy Federation, Brussels, 399-400.
- Lammerding, A. M. & M. P. Doyle. 1989.** Evaluation of enrichment procedures for recovering *L. monocytogenes* from dairy products. Int. J. Food Microbiol., 9 (3 ): 249-268.
- Lee, W. H. & D. McClain. 1986.** Improved *L. monocytogenes* selective agar. Environ. Microbiol., 52: 1215-17.
- Loessner, M. J. 1988.** Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp. Appl. Environ. Microbiol., 54: 3003-7.
- Lovett, J., D. W. Francis & J. M. F. Hunt. 1987.** *L. monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. J. Food Prot., 50: 188-192.
- Lovett, J. 1988.** Isolation and enumeration of *L. monocytogenes*. Food Technol., 42:172-5.
- Martin, R. S., R. K. Sumarah & M. A. Mac Donald. 1984.** A synthetic based medium for the isolation of *L. monocytogenes*. Clin. Invest. Med., 7: 233-7.
- McClain, D. & W. H. Lee. 1989.** Development of USDA-FSIS method for isolation of *L. monocytogenes* from raw meat and poultry. J. Assoc. Off. Anal. Chem., v. 71, p. 660-664, 1988. FSIS method for the isolation and identification of *L. monocytogenes* from processed meat and poultry products. Laboratory communication n° 57, revised 24 May 1989. U. S. D. A., FSIS, Beltsville, Md.
- Mesquita, A. J. 1991.** Bactérias do gênero *Listeria* em carne e água residuária de lavagem de carcaça de um matadouro-frigorífico e em carne bovina moída comercializada na cidade de Goiânia, Goiás. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP, 144p.
- Pini, P. N. & R. J. Gilbert. 1988.** A comparison of two procedures for the isolation of *L. monocytogenes* from raw chickens and soft cheeses. Int. J. Microbiol., 7: 331-7.
- Serafini, A. B. 1992.** *Listeria* spp.: comparação entre metodologias de isolamento em produtos cárneos comercializados em supermercados da cidade de Goiânia, Goiás. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP, 183p.
- Snedcor, G. W. & W. G. Cochram. 1980.** Statistical methods. 7 ed. Iowa State University Press. 507 p