

AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DE SANITIZANTES ALCALINO-CLORADOS CONTRA *LISTERIA MONOCYTOGENES*.

Erika Carolina Romão Bonsaglia
Ary Fernandes Junior

Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP- Botucatu, SP

Miriam Harumi Tsunemi
Ivana Giovanetti Castilho
Vera Lucia Mores Rall ✉

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP - Botucatu, SP.

✉ vlmores@ibb.unesp.br

RESUMO

Listeria monocytogenes é uma crescente preocupação para a indústria devido à sua capacidade de crescer em temperatura de refrigeração durante o armazenamento de alimentos. Falhas na erradicação dessa bactéria podem resultar em grandes perdas econômicas e sérios problemas de saúde pública. Este trabalho teve por objetivo analisar 32 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes alimentos frente a dois sanitizantes alcalino clorados em diferentes concentrações e tempos de exposição. Os resultados mostraram que o produto A, na concentração recomendada pelo fabricante, eliminou 46,8% das cepas no tempo mediano de 30 minutos. Já o produto B, eliminou 50% das cepas

no tempo mediano de 15 minutos. Concluímos que apesar de estar em suspensão a bactéria mostrou certa resistência ao produto alcalino clorado e o tempo de exposição representa um fator determinante para eficácia do produto.

Palavras-chave: Desinfecção. Resistência bacteriana. Concentrações. Tempo de exposição.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a growing concern for the industry due to its ability to grow at refrigeration temperature for food storage. Failures in the eradication of this bacterium can result in large economic losses and serious problems in public health.

This study aimed to analyze 32 strains of L. monocytogenes isolated from different foods in front of two chlorinated alkaline sanitizers at different concentrations and exposure times. The results showed that the product A at the concentration recommended by the manufacturer, removed 46.8% of the strains in the median time of 30'. Have the product B, eliminated 50% of the strains at the median of 15'. We conclude that despite being in the suspended bacteria showed some resistance to the chlorinated alkaline product and exposure time is the determining factor for product effectiveness.

Keywords: Disinfection. Bacterial resistance. Concentrations. Exposure time.

INTRODUÇÃO

A resistência de *Listeria monocytogenes* à maioria dos desinfetantes químicos, sob condições específicas, destaca a importância do desenvolvimento de novas abordagens de desinfecção e mais agentes de desinfecção eficientes (FRANK & KOFFI, 1989). Uma vez que concentrações mais elevadas de desinfetantes seriam necessárias para superar a resistência de *L. monocytogenes*, isso aumentaria a sua carga sobre o meio ambiente, constituindo perigo para a saúde dos funcionários. (ROY et al., 1993).

A atividade antimicrobiana dos desinfetantes pode ser influenciada por vários fatores, como sua composição química, a concentração, o tempo de contato, a presença ou ausência de matéria orgânica, a temperatura e o pH (MCDONNELL & RUSSELL, 1999; WIRTANEN & SALO, 2003; MEYER, 2006). O uso inadequado dos desinfetantes em relação ao tempo, concentração e temperatura pode levar à exposição regular dos contaminantes causando o surgimento de cepas persistentes que são difíceis de erradicar (MCDONNELL & RUSSELL, 1999), contribuindo para o desenvolvimento de biofilmes, os quais podem conter micro-organismos patogênicos (BOS et al., 2000).

O processo de higienização é mais eficiente quanto maior for o tempo de contato entre o agente sanitizante e a superfície, porém as reações ocorrem mais eficazmente nos minutos iniciais da aplicação dos agentes químicos (ANDRADE & MACEDO, 1996).

Nenhum composto sanitizante apresenta todas as características ideais para destruir todos os micro-organismos presentes no ambiente. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de analisar a eficácia de diferentes

concentrações de sanitizantes alcalinos clorados frente a cepas de *Listeria monocytogenes*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 30 cepas previamente identificadas, isoladas de leite, vegetais e ambientes de processamento, cedidas pelos laboratórios de Microbiologia de Alimentos da UNESP/Botucatu e pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Além de 2 cepas padrão ATCC 7644 e 16313.

Confirmação da espécie - foi pesquisado o gene *inlA* específico para *L. monocytogenes*, pela técnica da PCR (Polimerase Chain Reaction) (Rousseaux et al., 2004).

Análise por PCR do gene *inlA***Extração e Purificação de DNA**

Cada cepa de listeria foi inoculada em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C/24 h e 300 µL foram transferidos para tubos de microcentrífuga, submetidos à extração e purificação do DNA, empregando-se o kit comercial MINISPIN (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

O tubo foi centrifugado a 13.000 rpm/30 seg (Eppendorf 5415R), o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 40 µL de tampão de lisozima e 10 µL de lisozima; o tubo foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 15 minutos, com homogeneização ocasional. A seguir, foram adicionados 10 µL de proteinase K e homogeneizado. Após essa etapa, foram adicionados 500 µL de solução de extração, homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Todo volume foi transferido para uma coluna e centrifugado a 8.000 rpm/1 minuto. O volume filtrado foi descartado e novamente foram adicionados 500 µL de solução de extração na

coluna que foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto, descartando-se o volume filtrado. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução de lavagem e centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos, com descarte do filtrado. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, com adição de 200 µL de solução de eluição (água Milli Q autoclavada e previamente aquecida a 56°C em banho-maria), incubado à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado a 8.000 rpm durante 1 minuto. A amostra foi congelada a - 20°C até o momento do uso para a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Amplificação do ácido nucléico (PCR)

O volume de 25 µL foi composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x (Invitrogen), 0,75 µM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 200 µL de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada *primer* (R AATCTAGCACCACTGTCTGGG e F TGTGACCTTCTTTTACGGGC), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) empregando-se os parâmetros de ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, 94°C durante 2 minutos para desnaturação, 57°C/1 minuto para o anelamento dos primers e 72°C durante 1 minuto para extensão, gerando um produto de 733 pb. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Como controle positivo, foram utilizadas duas cepas padrão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e ATCC 16313 (ARNOLD et al., 2004).

Visualização dos produtos amplificados - os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power

SupplyModel EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.®) em gel de agarose 1,5% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com SYBR Green (2µl 10x/0,8µL de amostra - Invitrogen®). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 50 ou 100 pb, sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (Alphaimager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation®).

Preparo das diluições com os sanitizantes - foram testados 2 sanitizantes, à base de alcalino clorado, em cinco diluições diferentes, incluindo a recomendada pelo fabricante, em cinco tempos de contato.

Para o produto A as diluições utilizadas foram 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 e para o produto B as diluições utilizadas foram: 1/200, 1/300, 1/400, 1/500 e 1/600. (PEL-CZAR et al., 1996, modificado).

Preparo das culturas - as cepas de *Listeria monocytogenes* foram semeadas em tubos com caldo com BHI e incubadas por 35°C/24h. Após 24hrs de incubação, cada cultura foi diluída em solução salina ajustada à escala 0,5 McFarland. De cada diluição transferiu-se 0,1 mL para cada tubo com as diluições escolhidas dos sanitizantes, homogeneizado e cronometrado o tempo de exposição a partir do tempo exato da adição da cultura ao sanitizante.

Após os tempos de 0, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos de exposição, com auxílio de uma alça foram semeados em placas de TSA/YE. As placas foram incubadas a 35°C por 24horas. Após a incubação procedeu-se à leitura das placas.

Análise Estatística - na análise dos dados foi aplicado o teste de Friedman.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PCR do gene *inlA*.

Todas as amostras previamente identificadas como *Listeria monocytogenes* foram confirmadas, através da técnica de PCR, com a pesquisa do gene *inlA* (Figura 1).

Análise do tempo de exposição

Na comparação dos tempos e dos níveis de diluição para determinar o tempo necessário de exposição dos produtos para inibição do crescimento bacteriano, observou-se uma diferença no tempo mediano entre os níveis de diluição dos 2 sanitizantes (Tabela 1).

Como esperado, os produtos A e B apresentaram um melhor tempo mediano na diluição 1 quando comparado às outras diluições. Porém para a diluição recomendada pelo fabricante no Produto A o tempo mediano de exposição do produto foi de 30 minutos e das 32 cepas testadas, 15 (46,9%) morreram e para o Produto B o tempo mediano de exposição foi de 15 minutos eliminando 50% das cepas testadas. Best et al. (1990) testaram 14 desinfetantes, incluindo alcalinos clorados, frente a cepas de *L.monocytogenes* e relataram que todos foram eficazes em testes de suspensão, com redução de $> 5 \log_{10}$ UFC/ml.

É interessante ressaltar que, na embalagem de ambos os sanitizantes,

Figura 1 - Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *inlA*.

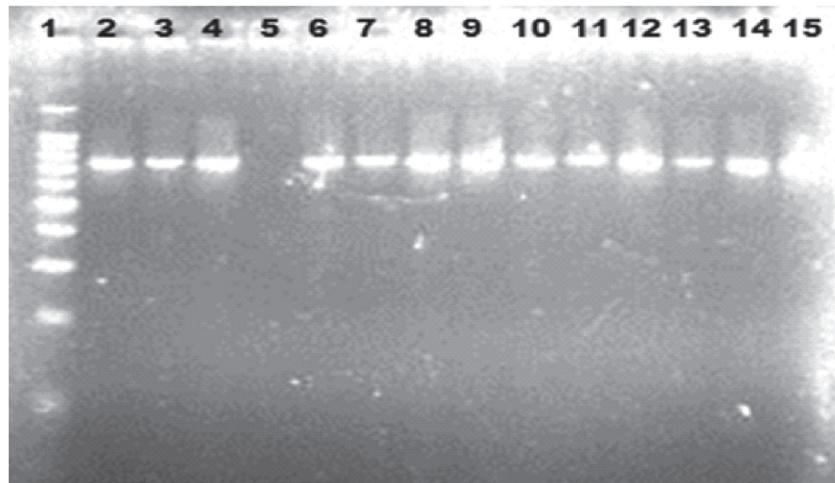


Tabela 1 - Estatística descritiva do tempo de exposição por produto e diluição das 32 cepas de *L. monocytogenes*, frente aos sanitizantes alcalino clorado.

	Sanitizante alcalino clorado A					Sanitizante alcalino clorado B				
	1/10	1/25*	1/50	1/100	1/200	1/200	1/300*	1/400	1/500	1/600
Mínimo	5,0	10,0	10,0	20,0	30,0	5,0	5,0	10,0	15,0	20,0
Média	17,3	23,4	27,0	28,8	30,0	12,7	18,4	21,9	26,3	29,1
Mediana	15,0	<u>30,0</u>	30,0	30,0	30,0	10,0	<u>15,0</u>	20,0	30,0	30,0
Desv.Pad	8,5	7,5	5,9	5,9	0,0	6,0	7,2	6,9	5,4	3,0
Máximo	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0

*Diluição recomendada pelo fabricante.

havia recomendações sobre a diluição adequada, mas não em relação ao tempo ideal. Assim, corre-se o risco de exposição por tempo inadequado, impossibilitando uma desinfecção realmente efetiva. Deve ser ressaltado que o tempo de 30 minutos que matou ao menos metade das bactérias na concentração recomendada no Sanitizante A é bem longo.

Em muitos casos, *L. monocytogenes* pode contaminar lugares de difícil acesso aos desinfetantes em plantas de processamento de alimentos. Em tais condições é possível que a resistência do organismo para esses agentes aumente através de respostas adaptativas, como a produção de biofilmes (LUNDEN et al., 2003).

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que *L. monocytogenes* pode apresentar variabilidade quanto à sua resistência aos compostos clorados e que esses produtos podem auxiliar no controle ou na diminuição dessas bactérias durante os processos de higienização dos equipamentos. Contudo, deve-se levar em consideração que os testes foram realizados em bactérias em suspensão podendo sua resistência ao produto ser maior quando estas se encontram na forma de biofilme.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. J.; MACEDO, J.A.B. **Higienização na indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 182p., 1996.
- ARNOLD, T.; SCHOLZL, H. C.; MARG, H.; ROSLER, U.; HENSEL, A. Impact of invA-PCR and Culture Detection Methods on Occurrence and Survival of *Salmonella* in the Flesh, Internal Organs and Lymphoid Tissues of Experimentally Infected Pigs. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 51, n.10, p. 459-463, 2004.
- BEST, M.; KENNEDY, M. E.; COATES, F. Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.2 p. 377-380, 1990.
- BOS, R.; VAN DER MEI, H.C.; GOLD, J.; BUSCHER, H.J. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. **FEMS Microbiology Review**, v.189, p.311-315, 2000.
- FRANK, F. J.; KOFFI, A. R. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal Food Protection**, v.53, p.550-554, 1989.
- LUNDEN, J., AUTIO, T., MARKKULA, A., HELLSTROM, S., KORKEALA, H. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, n.3, p.265-272, 2003.
- MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p.147-179, 1999.
- MEYER, B. Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? **International Journal of Food Microbiology**, 112, 275-279, 2006.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron books, 1996.
- ROUSSEAU, S.; OLIER, M.; LEMAITRE, J.P.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Use of PCR-Restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 4, p. 2180 - 2185, 2004.
- ROY, B.; ACKERMANN, H. W.; PANDIAN, S.; PICARD, G.; GOULET, J. Biological Inactivation of Adhering *Listeria monocytogenes* by Listeriaphages and a Quaternary Ammonium Compound. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2914-2917, 1993.
- WIRTANEN, G.; SALO, S. Disinfection in food processing – Efficacy testing disinfectants. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.2, p.293-306, 2003. ❖



PUBLICAÇÃO DA FAO TRATA DA HIGIENE NA CADEIA DO PESCADO.

Pescado e derivados figuram entre os alimentos mais comercializados no mercado internacional. Controle e inspeções efetivas na cadeia de comercialização de pescado são extremamente importantes para sua inocuidade e a proteção do consumidor.

Uma nova publicação da FAO sob o título de Requisitos de higiene, controles e inspeções na cadeia de comercialização de pescado foi lançada em Inglês e Russo e está à disposição na página da FAO <http://www.fao.org/docrep/018/i3221b/i3221b.pdf>