

***Clostridium estertheticum* EM SUPERFÍCIE DE MEIAS-CARCAÇAS DE BOVINO E CORTES CÂRNEOS COMERCIAIS**

MESQUITA, Adriano Queiroz de¹; **RAUECKER**, Ursula Nunes²; **FRANÇA**, Leonardo²; **DEL'ACQUA**, Tiago Vilela¹; **MESQUITA**, Albenones José de³; **NUNES**, Iolanda Aparecida⁴

Palavras-chave: *clostridium estertheticum*, PCR, carnes embaladas a vácuo,

1. INTRODUÇÃO

Em 1988, uma espécie de *Clostridium* psicrófilico foi isolada em Langford, Reino Unido, de um pacote estufado de carne bovina embalada a vácuo importado da África do Sul (DAINTY et al., 1989). Posteriormente, ele foi denominado *Clostridium estertheticum* (COLLINS et al., 1992). Desde então deteriorações semelhantes foram relatadas em carne bovina, ovina e de cervo, embaladas a vácuo na Nova Zelândia (BRODA et al., 1996). Para se pesquisar a origem do problema desenvolveu-se o sistema de detecção por PCR. Casos de estufamento de embalagens de carne bovina refrigerada foram observados em produtos de frigoríficos das regiões Centro-Oeste e Sul do país, levantando a suspeita de contaminação pelo *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*. Faz-se necessário, portanto, o desenvolvimento de pesquisa objetivando o isolamento e a identificação do agente e, conseqüentemente, apontar possíveis medidas de controle que visem redução do microrganismo no ambiente do estabelecimento de abate.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostragem

Para a escolha dos estabelecimentos de abate, foram adotados os seguintes critérios: ser habilitado para realizar comércio internacional, estar incluído na lista geral de exportação e ter experimentado um incidente de estufamento de embalagem de carne bovina refrigerada embalada a vácuo. Foram colhidas 423 amostras de carnes bovinas, sendo 230 de superfície de meias carcaças e 193 de cortes cárneos resfriados embalados a vácuo, obtidos de matadouros-frigoríficos localizados em Goiás, São Paulo e Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Pará, Minas Gerais e Bahia. Para a colheita das amostras de superfícies e cortes cárneos foram utilizados "swabs" umedecidos em solução salina 0,85%. As amostras foram identificadas com etiquetas adesivas, acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo em escamas e encaminhadas ao laboratório. As carnes embaladas a vácuo foram igualmente encaminhadas em caixas isotérmicas, observando-se a integridade física das embalagens e a manutenção de baixas temperaturas dos cortes.

2.2 Técnica de PCR

Os "swabs" foram embebidos em 5 mL de solução salina a 0,85%. As amostras foram submetidas à extração direta, sem pré-enriquecimento, após choque térmico a 80°C/10min, antes de se iniciar as extrações, a fim de se induzir a germinação dos

esporos. Após serem homogeneizadas em vortex, foram retirados 3 mL para a extração de DNA genômico. Foi utilizado o par de iniciadores “Revised forward primer (5’ TGATCGCATGATCTTAACATCAAAG 3’) e Revised reverse primer (5’ TCGACCCCCGACACCTAGTATT 3’)”, para o *Clostridium estertheticum* (HELPS et al., 1999), que fornece um produto de amplificação de 641 pares de base. Os reagentes utilizados nas misturas das reações de PCR e concentrações finais dos reagentes foram tampão 10x (5µl), Solução de DNA (100 ng/5µl), Iniciador 0,3mM, DNTP 0,2mM, MGCl₂ 1,5mM, Taq DNA polimerase 1U totalizando um volume final de 50µl. As condições da reação de PCR seguiram os seguintes parâmetros: desnaturação inicial 94°C/5min, 40 ciclos (Desnaturação 94°C/1min, Anelamento 60°C/1min, Extensão 72°C/1min), extensão final (72°C/10min). Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (pH 8,0) a uma voltagem de 110V.

2.2.1 Extração do DNA genômico

A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia proposta por van SOOLINGEN et al. (1991).

2.2.2 Verificação da pureza e determinação da concentração do DNA

A eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 0,5X (pH 8,0) foi utilizada para o monitoramento e avaliação da técnica de extração de DNA, verificando se o DNA está íntegro ou desnaturado, sua pureza e também para a sua concentração, comparando as amostras com um DNA de concentração previamente conhecida (lambda DNA íntegro). Somente as amostras de DNA que se mostraram como bandas compactas na parte superior do gel, à altura da primeira banda do padrão de peso molecular, foram considerados como de qualidade desejável. Após a verificação da eficiência do processo de extração e da qualidade do DNA obtido, realizava-se a quantificação do mesmo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram processadas 423 amostras de carnes, sendo 193 de cortes comerciais embalados a vácuo e 230 de superfície de meias-carcaças resfriadas, procedentes de Matadouros-Frigoríficos que realizam comércio internacional localizados em oito Estados da Federação.

A Tabela 1 apresenta dos resultados das 423 amostras de carnes bovinas analisadas, sendo 193 de cortes comerciais embalados a vácuo e 230 de superfícies de meias-carcaças resfriadas, procedentes de alguns Matadouros-Frigoríficos sob Serviço de Inspeção Federal permanente.

TABELA 1. Distribuição de *C. estertheticum*, segundo as fontes de detecção

AMOSTRA	<i>C. estertheticum</i> (PCR)			
	POSITIVAS		NEGATIVAS	
	N.	%	N.	%
Superfície de meias-carcaças	27/230	11,7	203/230	88,3
Cortes comerciais	27/193	14,0	166/193	86,0
Total	54/243	22,2	189/243	77,8

Nas Tabelas 2 e 3 pode ser observada a distribuição de *C. estertheticum* em amostras de carnes bovinas, segundo sua origem geográfica.

Na Tabela 3 encontra-se a distribuição de *C. estertheticum* em superfície de meias-carcaças resfriadas e cortes comerciais refrigerados embalados a vácuo, segundo a origem geográfica.

TABELA-2 Distribuição de *C. estertheticum* em carnes bovinas em alguns Estados brasileiros

ESTADO DE ORIGEM	<i>C. estertheticum</i>			
	POSITIVAS		NEGATIVAS	
	N.	%	N.	%
SÃO PAULO	28/221	12,7	193/221	87,3
MATO GROSSO	12/69	17,4	57/69	82,6
GOIÁS	04/47	8,5	43/47	91,5
MATO GROSSO DO SUL	04/41	9,8	37/41	90,2
MINAS GERAIS	02/18	11,1	16/18	88,2
RONDÔNIA	0/11	0,0	11/11	100,0
PARÁ	0/09	0,0	09/09	100,0
BAHIA	01/07	14,3	06/07	85,7

TABELA-3 Distribuição de *C. estertheticum* em superfície de meias-carcaças e cortes comerciais de bovinos, segundo a procedência das amostras

ESTADO DE ORIGEM	<i>C. estertheticum</i>			
	POSITIVAS		NEGATIVAS	
	N.	%	N.	%
SUPERFÍCIE DE MEIAS-CARÇAÇAS				
SÃO PAULO	15/112	13,4	97/112	86,6
MATO GROSSO	07/47	14,9	40/47	85,1
MATO GROSSO DO SUL	03/26	11,5	23/26	88,5
GOIÁS	0/15	0,0	15/15	100,0
MINAS GERAIS	02/13	15,4	11/13	84,6
RONDÔNIA	0/07	0,0	07/07	100,0
PARÁ	0/06	0,0	06/06	100,0
BAHIA	0/04	0,0	04/04	100,0
TOTAL	27/230	11,7	203/230	88,3
CORTES COMERCIAIS				
SÃO PAULO	13/109	11,9	96/109	88,1
GOIÁS	07/32	21,8	25/32	78,2
MATO GROSSO	05/22	22,7	17/22	77,3
MATO GROSSO DO SUL	01/15	6,6	14/15	93,4
BAHIA	01/03	33,3	02/03	66,7
MINAS GERAIS	0/05	0,0	05/05	100,0
RONDÔNIA	0/04	0,0	04/04	100,0
PARÁ	0/03	0,0	03/03	100,0
TOTAL	27/193	14,0	166/193	86,0

4. CONCLUSÕES

- Os cortes cárneos resfriados embalados a vácuo apresentaram índices de positividade para *C. estertheticum* foram superiores aos verificados em *swabs* de superfície de meias-carcaças;
- O aumento da contaminação após o resfriamento das meias-carcaças, provavelmente seja devido à manipulação durante a desossa e embalagem dos cortes;
- os percentuais de amostras de carnes contaminadas por *C. estertheticum* podem ser considerados elevados, em especial naquelas procedentes de Mato Grosso e São Paulo;

- Não foram detectadas amostras positivas para *C. estertheticum* em amostras de superfície de meias-carcaças procedentes de Goiás, Rondônia, Pará e Bahia, enquanto que nas de cortes cárneos em Minas Gerais, Rondônia e Pará;
- Os resultados obtidos no presente trabalho indicam a disseminação de *C. estertheticum* nos diferentes Estados brasileiros. Apesar da bactéria não ter sido detectada em amostras procedentes do Pará e Rondônia, não se pode assegurar sua ausência nestes dois Estados, sendo necessária a análise de um maior número de amostras.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRODA, D.M., BOEREMA, J.A, and BELL, R.G., A PCR survey of psychrotropic *Clostridium Botulinum*-like esolates for the presence of BoNT genes. **Letters Applied in. Microbiology**, 27, pp. 219-223, 1998.

BRODA, D.M., DELACEY, K.M., BELL, R.G., BRAGGINS, T.J. and COOK, R.L. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with “Blown pack” spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. **International Journal of Food Microbiology**. 29, pp.335-352, 1996.

COLLINS, M.D., RODRIGUES, U.M., DAINTY, R.H., EDWARDS, R.A. and ROBERTS, T.A. Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. **FEMS Microbiology. Lettes**, v 96, pp. 235-240, 1992.

DAINTY,R.G., EDWARDS, R.A. and HIBBARD, C.R. Spoilage of vacuum-packed by a *Clostridium* sp.. **Sci, Food Agric**. 49, pp. 473-486, 1989

HELPS, C.R., HARBOUR, D.A., AND CORRY, J.E. PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage en vacuum-packed chill-stored beef. **International Journal of Food Microbiology**. 52, pp. 57-65, 1999.

van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; HAAS, P. E. W.; SOLL, E. R. van EMBDEN, J. D. A. Occurence and stability of insertion sequences in sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiology**, 29, p 2578-86, 1991.

FONTE DE FINANCIAMENTO - CNPq/PIBIC

¹ Bolsistas de Iniciação Científica/PIBIC

² Mestrandos em Ciência Animal – UFG

³ Professor da Escola de Veterinária – UFG mesquita@funape.org.br

⁴ Orientadora, Professora da Escola de Veterinária – UFG inag@terra.com.br