



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**OCORRÊNCIA DE *LISTERIA* SPP. EM  
EMBUTIDOS RESFRIADOS COMERCIALIZADOS  
NA CIDADE DO RECIFE - PE**

RECIFE  
2010

ANÍZIA MARIA VIEIRA DE SOUZA LAPENDA

**OCORRÊNCIA DE *LISTERIA* SPP. EM EMBUTIDOS  
RESFRIADOS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DO  
RECIFE - PE**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PGCTA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marinho de Carvalho Neto

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura

RECIFE  
2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

L311o Lapenda, Anízia Maria Vieira de Souza  
Ocorrência de *Listeria* spp em embutidos resfriados comercializados na cidade do Recife, PE / Anízia Maria Vieira de Souza Lapenda – 2010.  
74 f.: il.

Orientador: Pedro Marinho de Carvalho Neto  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Economia Doméstica, Recife, 2010.

Referências

1. Microbiologia de alimentos 2. Segurança alimentar 3. *Listeria* spp.  
4. Embutidos I. Carvalho Neto, Pedro Marinho de, orientador II. Título

CDD 576.163



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**OCORRÊNCIA DE *LISTERIA SPP.* EM EMBUTIDOS RESFRIADOS  
COMERCIALIZADOS NA CIDADE DO RECIFE/PE.**

Por: Anízia Maria Vieira de Souza Lapenda

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 02 de março de 2010, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em sua forma final.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> ***Tânia Lúcia Montenegro Stamford***  
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. ***Rinaldo Aparecido Mota***  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> ***Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura***  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico,

Aos meus pais (*in memoriam*),  
por tudo que me ensinaram e todo o apoio necessário  
para que fosse possível trilhar o caminho da minha vida profissional.

Às minhas filhas *Marcella e Nathália*,  
que sirva de espelho na trajetória profissional que está por vir.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar sempre presente em todos os momentos de conquistas e dificuldades;

A minha família, em especial meu esposo e filhas, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo apoio dado em todos os momentos de estudo e preparação.

A todos os professores e funcionários, do Departamento de Ciências Domésticas (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos), pelos conhecimentos e amizade;

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária, em especial, à minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Andrea Paiva, pela orientação, perseverança, carinho, por todas as palavras de apoio, dedicação, enfim, por acreditar!!! À Prof<sup>a</sup> Rita, pela confiança e apoio, ao Prof. Léo, mesmo dizendo “não” me socorreu em vários momentos, e ao Prof. Júnior, pelo apoio estatístico, muito obrigada!

A todos os amigos que souberam compreender a minha ausência e aqueles que estiveram presente me apoiando e colaborando intensamente com esta pesquisa, em especial a Mércia, Mariana (Isaurinha), Cosme, Érica, Nair, André, Orestes, Pedro. A todos vocês minha eterna gratidão e amizade.

A turma do mestrado, por todos os momentos que passamos juntos. Valeu!!!

Ao Lanagro, em especial as Dr<sup>as</sup>. Diana e Dalila, pela oportunidade e apoio.

A bioMérieux, pelo patrocínio dos kits imprescindíveis na execução desta dissertação.

*Não conseguiria falar de todos... Mas jamais me esquecerei dos que me apoiaram, me ouviram e me ajudaram durante estes anos.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATCC – American Type Culture Collection  
ATN – Ágar Triptose com Ácido Nalidíxico  
AP – Ágar Palcam  
APHA – American Public Health Association  
CAMP – Christie-Atkins-Munch-Petersen  
CCFH – Comitê de Higiene dos Alimentos  
CDC – Center for Disease Control and Prevention  
CIM – Concentração inibitória mínima  
ELFA – Enzyme Linked Fluorescent Assay  
FAO – Food Agriculture Organization  
FDA – Food and Drug Administration  
IN – Instrução Normativa  
LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário  
LBMA – Ágar sangue *L. Monocytogenes*  
LX – Listeria Express  
LDUO – Listeria duo (*Listeria spp.* e *Listeria monocytogenes*)  
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards  
NMP – Número mais provável  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
OPHS – Office of Public Health and Science  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)  
SIF – Serviço de Inspeção Federal  
UFC – Unidade formadora por colônia  
UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
UVM – University Vermont Modified

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	<i>Listeria</i> spp. corada pelo método Gram	8
Figura 2:	<i>L. monocytogenes</i> em Ágar sangue de carneiro	12
Figura 3:	Fator de Virulência	14
Figura 4:	Barrete e Cone do <i>kit</i> VIDAS® LDUO	38
Figura 5:	API Listeria	39



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Característica fenotípicas e bioquímicas utilizadas na discriminação de <i>Listeria</i> spp.	60
TABELA 2. Detecção de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Listeria</i> spp. pelo sistema VIDAS® e método convencional nas 48 amostras de embutidos analisados por RPA	61
TABELA 3. Confirmação das amostras positivas de <i>Listeria</i> spp. isoladas de embutidos por Região Política Administrativa (RPA)	62
TABELA 4. Distribuição das amostras detectadas de <i>Listeria</i> spp. em embutidos por Região Política Administrativa (RPA)	64
TABELA 5. Distribuição das amostras detectadas para <i>L. monocytogenes</i> em embutidos (salsichas e presuntos) de quatro marcas distintas (A, B, C e D) por RPA	64
TABELA 6. Perfil de sensibilidade dos isolados de <i>Listeria</i> obtidos de embutidos resfriados comercializados em Recife, PE	66
TABELA 7. Avaliação da resistência as amostras de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i> isoladas dos embutidos	67

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
Geral	5
Específicos	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
Gênero <i>Listeria</i>	7
Taxonomia, Caracterização Morfológica e Bioquímica	7
Distribuição na Natureza	10
Fatores de Virulência e Mecanismos de Patogenicidade	12
Determinantes da Invasão Intracelular	14
Dose Infectante e Período de Incubação	15
Listeria em Alimentos	18
Listeriose	20
Surto	22
Segurança Alimentar	24
<i>Listeria</i> spp. em embutidos	25
Resistência Antimicrobiana	28
Embutidos	31
Metodologias utilizadas para isolamento de <i>Listeria</i>	33
Métodos Convencionais	33
Métodos Rápidos	36
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	40
RESULTADOS	51
Artigo: <i>Detecção e perfil de sensibilidade antimicrobiana de Listeria spp. isolada em salsichas e presuntos resfriados comercializados em Recife - PE, Brasil</i>	52
CONCLUSÃO GERAL	73

## RESUMO

Por ser a *Listeria* spp. em especial a *L. monocytogenes* uma das principais preocupações da indústria alimentícia e dos órgãos de Saúde Pública, pela habilidade de sobreviver e multiplicar-se em condições tecnicamente indicadas para conservação de alimentos como temperatura de refrigeração; aliado à sua resistência ao congelamento, ao calor e aos diversos antibióticos, tornou-se microrganismo emergente e de grande importância entre os patógenos transmitidos por alimentos, como os embutidos de carne, frango cru e cozido, carne crua, peixes crus e defumados prontos para o consumo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de embutidos resfriados. Foram analisadas 48 amostras de presuntos e salsichas, obtidos de mercados públicos e supermercados distribuídos nas seis Regiões Político Administrativas da cidade do Recife, quanto à presença e ausência de *Listeria* spp. através de métodos imunoenzimático e convencional, além de avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana através do método de disco-difusão. Quanto à presença de *Listeria* spp. destacou-se o sistema VIDAS<sup>®</sup> LDUO por detectar 28 (58,33%) amostras positivas para *Listeria* spp., enquanto que no método convencional detectou-se 27 (56,25%) amostras positivas, das quais 15 (53,57%) amostras foram identificadas para *L. monocytogenes*. Revelando assim, um alto percentual de *Listeria monocytogenes* nos alimentos analisados e conferindo ao método uma alta sensibilidade e especificidade para o agente estudado. O perfil de sensibilidade antimicrobiana das amostras testadas evidenciaram valores entre 92,6% a 100% para os antibióticos testados, ficando apenas a Ciprofloxacina com perfil de sensibilidade de 78%, destacando ainda a presença de uma amostra de *Listeria monocytogenes* multiresistente para Vancomicina, Ampicilina, Amoxicilina, e Ciprofloxacina. Os resultados obtidos não esclarecem sobre a origem desta contaminação, necessitando assim, monitorar as etapas de produção desses alimentos nas indústrias e no comércio varejista e implantar limites para a *L. monocytogenes* em alimentos cárneos resfriados prontos para o consumo, no intuito de se possibilitar uma garantia na oferta de alimentos de qualidade.

**Palavras chave:** *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, salsichas e presuntos, sistema VIDAS<sup>®</sup> LDUO, sensibilidade antimicrobiana, alimento de qualidade.

## ABSTRACT

Because *Listeria* spp. especially *L. monocytogenes*, a major concern of food industry and public health agencies, the ability to survive and multiply under conditions technically suitable for food preservation as coolant temperature, coupled with its resistance to freezing, heat and various antibiotics, became microorganism emerging and very important among the pathogens transmitted by foods such as meat sausages, raw and cooked poultry, raw meat, raw and smoked fish ready for consumption. This study aimed to evaluate the occurrence of *Listeria* spp. in sausage samples cooled. We analyzed 48 samples of hams and sausages, obtained from public markets and supermarkets in six regions distributed Political Administration of the city of Recife, the presence and absence of *Listeria* spp. through enzyme immunoassay and conventional methods, and to evaluate the profile of antimicrobial sensitivity by disk diffusion method. Regarding the presence of *Listeria* spp. stood out the VIDAS<sup>®</sup> LDUO system for detecting 28 (58.33%) samples positive for *Listeria* spp., whereas the conventional method were detected 27 (56.25%) positive samples, of which 15 (53.57% ) samples were characterized for *L. monocytogenes*. Thus revealing a high percentage of *Listeria monocytogenes* in food analysis and giving the method a high sensitivity and specificity for the agent studied. The profile of antimicrobial sensitivity of the samples tested showed values between 92.6% to 100% for the antibiotics tested, leaving only the profile of ciprofloxacin with a sensitivity of 78%, also emphasizing the presence of a sample of *Listeria monocytogenes* multiresistant to Vancomycin, Ampicillin, Amoxicillin, and Ciprofloxacin. The results do not explain the origin of this contamination and thus require, monitor the steps of producing such food industries and retail trade and establish limits for *L. monocytogenes* in meat foods chilled ready to eat in order to enable a security in the supply of quality food.

**Keywords:** *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, sausages and hams, VIDAS<sup>®</sup> LDUO system, antimicrobial sensitivity, food quality.

## **INTRODUÇÃO**

---

As indústrias de alimentos, em especial dos produtos de origem animal, vêm investindo em tecnologias de ponta desde a área de produção da matéria-prima até a área de processamento, tanto para o fornecimento no mercado interno como para o mercado internacional. Tal fato visa aumentar a segurança e a qualidade dos alimentos produzidos pelas indústrias brasileiras, ampliando a sua competitividade nos mercados nacional e internacional. Como também a redução de doenças causadas aos consumidores pela contaminação na ingestão e manipulação de alimentos.

Contudo, a melhoria de condições dos serviços públicos de saúde e direitos do consumidor está evidenciando um aumento no número de casos de doenças transmitidas por alimentos, o que exige dos fabricantes de produtos alimentícios, novas ações relacionadas à segurança alimentar. Estimativas realizadas nos Estados Unidos, pelo CDC, mostram que setenta e seis milhões de casos de enfermidades relacionadas ao consumo de alimentos ocorrem a cada ano, onde cinco mil destes casos são fatais (MEAD *et al.*, 1999). E a *Listeria monocytogenes* tem sido constantemente relacionada como patogênica ao homem, estando envolvida em surtos de origem alimentar e sendo relatada em produtos de frango.

O aumento da produção brasileira de carnes de aves e o aumento das exportações fazem com que exista uma preocupação sobre a possibilidade de ocorrência dessa bactéria em carcaças de frangos brasileiros (BARBALHO *et al.*, 2005).

A incidência de listeriose tem sido crescente nos últimos anos e, dentre as doenças transmitidas por alimentos, é considerada a de maior taxa de fatalidade.

Além de se encontrar amplamente disseminada na natureza, a *L. monocytogenes* possui a habilidade de sobreviver em condições adversas, resistência a diversos antibióticos e capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, o que a torna um importante patógeno de origem alimentar.

Pesquisas de sobrevivência de *L. monocytogenes* em embutidos fermentados secos têm revelado que, embora o crescimento seja reprimido pela combinação de vários fatores, como: baixo pH, baixa atividade de água, presença de cloreto de sódio e nitrito de sódio, entre outros, esse microrganismo pode sobreviver no produto final.

Tendo em vista a importância deste microrganismo no contexto da saúde pública, no que diz respeito à segurança dos alimentos de origem animal, este trabalho se propõe pesquisar a ocorrência de *Listeria* spp. em embutidos resfriados comercializados em diversos estabelecimentos da cidade do Recife - PE.

## **OBJETIVOS**

---



## Geral

Avaliar a Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de embutidos resfriados comercializados na cidade do Recife-PE.

## Específicos

- ✓ Pesquisar simultaneamente a presença de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. através do sistema VIDAS<sup>®</sup> LDUO.
- ✓ Detectar a presença de *Listeria* spp. em embutidos resfriados por método convencional.
- ✓ Identificar bioquimicamente as espécies de *Listeria* spp. isoladas dos embutidos.
- ✓ Determinar o perfil de sensibilidade antimicrobiana das cepas isoladas de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. dos embutidos, frente aos antibióticos de uso veterinário e humano.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

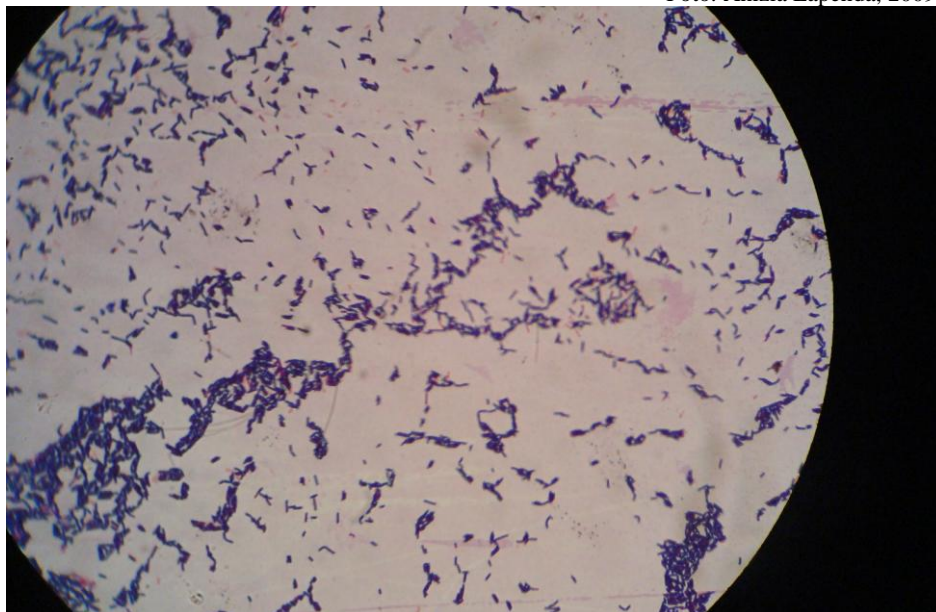
---

## **Gênero Listeria**

### **Taxonomia, Caracterização Morfológica e Bioquímica**

A *Listeria* corresponde a um gênero de microrganismos em forma de bastonete Gram-positivo curto, não formador de esporos, anaeróbios facultativos, com extremidades arredondadas, medindo 0,4 a 0,5 $\mu$ m de diâmetro por 0,5 a 2,0 $\mu$ m de comprimento e que não coram pela coloração do ácido rápido. Em relação às características bioquímicas, é catalase positiva, oxidase negativa, móvel a 20°C, algumas espécies são  $\beta$  hemolíticas em ágar sangue e associadas como potencialmente patogênicas para humanos e animais (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*) e apresenta crescimento na faixa de 2,5°C a 44°C, suportando repetidos congelamentos e descongelamentos (JAY, 2005). Fermenta a glicose produzindo, principalmente, ácido lático. Apresenta teste positivo para vermelho de metila e Voges-Proskauer. Não utiliza citrato exógeno e não produz indol. Hidrolisa piruvato de sódio e esculina. Não hidroliza uréia, gelatina e caseína (SEELIGER; JONES, 1986).

Foto: Anízia Lapenda, 2009

Figura 1: *Listeria* spp. corada pelo método Gram

A diferença entre as espécies baseia-se em testes de fermentação de carboidratos, produção de hemólise em ágar sangue, incluindo o teste Camp, e o teste de patogenicidade a camundongos (SEELIGER; JONES, 1986). Segundo DALLAS *et al.* (1995), *L. seeligeri* é menos hemolítica do que *L. monocytogenes*. Isto pode servir de diferenciação entre as espécies.

A prova de CAMP realizada com *Staphylococcus aureus* para diferenciar *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria*, observa-se comumente, uma área retangular de hemólise acentuada (KONEMAN *et al.*, 2001).

Em estudos sobre fermentação de carboidratos foi observado que *Listeria* spp. em condições anaeróbias utilizam somente hexoses e pentoses como substrato para seu crescimento. O crescimento rápido de *L. monocytogenes* e *L. innocua* ocorre na presença de carboidratos, especialmente, quando é usada a glicose como fonte de carbono. Enquanto a *L. murrayi* utiliza galactose, já a *L. ivanovii* e *L. seeligeri* são as

únicas que fermentam xilose (SEELIGER; JONES, 1986, FARBER; PETERKIN, 1991).

A *L. monocytogenes* é móvel a 20-25°C devido a flagelos peritríquios, apresentando movimento característico denominado tombamento ou turbilhonamento que auxilia na sua identificação, mas a 37°C a produção de flagelos é reduzida notavelmente (FARBER; PETERKIN, 1991; TODAR, 2003). A motilidade de *L. monocytogenes* em ágar semi-sólido pode ser determinada à temperatura ambiente. É característico o desenvolvimento, em forma de guarda-chuva, 2 a 5mm abaixo da superfície do ágar (KONEMAN *et al.*, 2001).

Sua característica psicrotrófica depende da integridade celular e de um sistema de transporte energético resistente ao frio, que estimula o metabolismo sob baixas temperaturas, propiciando altas concentrações de substratos intracelulares e uma fase lag prolongada em temperaturas de refrigeração (FRANCO, 2002).

Em seus estudos, Silva *et al.*, (1998), concluem que a *L. monocytogenes* é um halo tolerante de altas concentrações de NaCl, sendo capaz de crescer em 10% de NaCl e Atividade de água (aw) de 0,93. Algumas linhagens podem tolerar ambientes de 20% de NaCl e de 0,83. Segundo estes mesmos autores, a *L. monocytogenes* em ambientes com 25,5% de NaCl, sobrevive por cento e trinta e dois dias a 4°C, trinta e dois dias a 22°C e cinco dias a 37°C. Ressalta-se que a *Listeria* pode estar presente, principalmente em saladas, pratos prontos para consumo e até alimentos refrigerados, pois suportam bem as temperaturas baixas, como aquelas dos refrigeradores caseiros.

É composta por seis espécies, entre as quais a *L. monocytogenes*, é o agente causador da listeriose em homens e animais. (SILVA *et al.*, 2004).

As espécies reconhecidas são: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*. A espécie *L. denitrificans* foi transferida para o gênero *Jonesia*. No que diz respeito à sorologia, foram descritos dezesseis sorovares, sendo quinze antígenos somáticos “O” e cinco antígenos flagelares “H”. A principal espécie patogênica, *L. monocytogenes*, é representada por treze sorovares, alguns dos quais são compartilhados com *L. innocua* e *L. seeligeri*. Os sorovares mais frequentemente isolados são dos tipos 1 e 4. Nos Estados Unidos e no Canadá, o sorovar 4b tem sido encontrado em 65 a 80% de todas as linhagens. Em geral linhagens 4b são mais associados com surtos e parece possuir propriedades de virulência maiores que os demais sorovares e são mais relacionadas com produtos alimentícios (JAY, 2005).

Apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (denominada antigamente *L. bulgarica* e *L. monocytogenes* sorovar 4) estão associadas com doenças humanas (KONEMAN *et al.*, 2001).

A sorotipagem de *L. monocytogenes* apresenta grande importância epidemiológica, já que, embora esse microrganismo apresente treze sorotipos, três deles (1/2a, 1/2 b e 4b) são os mais relacionados a casos e surtos de listeriose transmitida por alimentos, sendo que 95% dos isolamentos realizados em seres humanos acometidos da doença pertencem a esses sorotipos (VITAS *et al.*, 2004).

## **Distribuição na Natureza**

As Listerias estão amplamente distribuídas no meio ambiente, e podem ser encontradas em vegetação deteriorada, águas superficiais, esgotos domésticos, águas residuárias de indústrias de laticínios e de abatedouros, em solos, insetos, adubo

orgânico e em fezes de animais e inclusive de humanos. Pode também ser isolada em diversos produtos alimentícios sejam crus ou após tratamentos térmicos ou químicos (RAMALHO; CEBALLOS, 2001).

Esse microrganismo foi encontrado em mais de quarenta espécies de mamíferos (incluindo bovinos e ovinos) e treze espécies de aves (domésticas e silvestres), e também foi isolado de pulgas, carrapatos e crustáceos (KONEMAN *et al.*, 2001).

A listeriose aparentemente é mais frequente nos climas temperados que nos tropicais. Ocorre em todas as espécies de animais domésticos, sendo mais comum em ruminantes, coelhos e aves (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Provavelmente por ser tão ampla a distribuição, o microrganismo contamine com frequência os alimentos durante a produção ou processamento dos mesmos (KONEMAN *et al.*, 2001).

A maior importância da *L. monocytogenes* para a indústria de alimentos talvez seja o fato dela poder sobreviver e se multiplicar em temperatura de refrigeração. Este fator constitui em obstáculo para a maioria dos patógenos. Esse dado é relevante principalmente para os alimentos refrigerados prontos para consumo em caso de serem insuficientemente processados e/ou contaminados após o processamento (McCARTHY, 1997).

## Fatores de Virulência e Mecanismos de Patogenicidade

Das espécies de *Listeria*, a *L. monocytogenes* é o patógeno de importância para os humanos e tem como fator de virulência mais significativo a listeriolisina O, responsável pela produção de beta-hemólise em eritrócitos e pela destruição de células fagocíticas que os engolfam (JAY, 2005).

A hemólise é uma importante característica, que poderá ser diretamente relacionada com a patogenicidade da *Listeria*, desde não hemolítica *Listeria* spp. são praticamente consideradas não patogênicas (COURTIEU, 1991). A hemólise é o principal fator de virulência de *L. monocytogenes*, outras duas espécies de *L. seeligeri* e *L. ivanovii*, são  $\beta$ -hemolíticas, sendo que a espécie não-patogênica (*L. seeligeri*) forma um estreito halo de hemólise, similar ao de *L. monocytogenes*, já a *L. ivanovii* produz um halo muito maior (KONEMAN *et al.*, 2001).

Foto: Anízia Lapenda, 2009

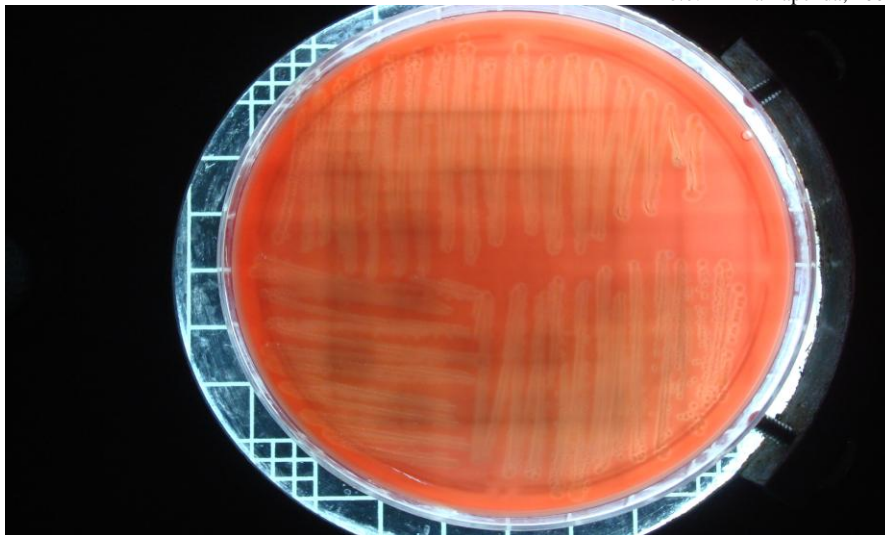


Figura 2: *L. monocytogenes* em Agar sangue de carneiro.



Tem sido observado que todas as amostras de *Listeria* patogênica são hemolíticas, mas nem toda *Listeria* hemolítica é patogênica (HOF; ROCOURT, 1992).

A listeriolisina “O” é uma importante enzima que ajuda a bactéria a escapar da ação de enzimas dos fagossomos do sistema imune do hospedeiro. Dentro do fagossomo o pH é mais ácido, isso estimula a bactéria a liberar a listeriolisina O que começa a desestabilizar a membrana do fagossomo, e, assim, induz a formação de poros em sua membrana, até o seu completo rompimento. Após esse rompimento, enzimas hidrolíticas são liberadas no citosol da célula hospedeira, provocando sua destruição (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

A patogenicidade de *L. monocytogenes* depende da habilidade para sobreviver e multiplicar nos macrófagos e outras células hospedeiras (KREFT; VAZQUEZ-BOLAND, 2001).

Os genes determinantes da virulência de *L. monocytogenes*, incluem a hemolisina (listeriolisina “O”), dois fosfolipases, e uma proteína Actina (ActA) essencial para a mobilidade intracelular do microrganismo patogênico, e fica situada em um conjunto bem definido do gene no cromossomo da bactéria. Sobre a infecção em células hospedeiras, a bactéria é internalizada em vacúolos. A listeriolisina O promove a saída do vacúolo de dentro do citoplasma, onde o microrganismo se replica. A bactéria intracitoplasmática usa a ação das células hospedeiras, em conjunto com sua proteína ActA, para promover sua mobilidade intracelular, através de pseudo-invaginações para células hospedeiras adjacentes. Por fim, as bactérias escapam da nova dupla membrana que limitam o vacúolo por meio da listeriolisina “O” e dos fosfolipases e o ciclo se repete (TILNEY, 1989 *apud* KATHARIOU, 2002).

Fonte: bio-Mérieux

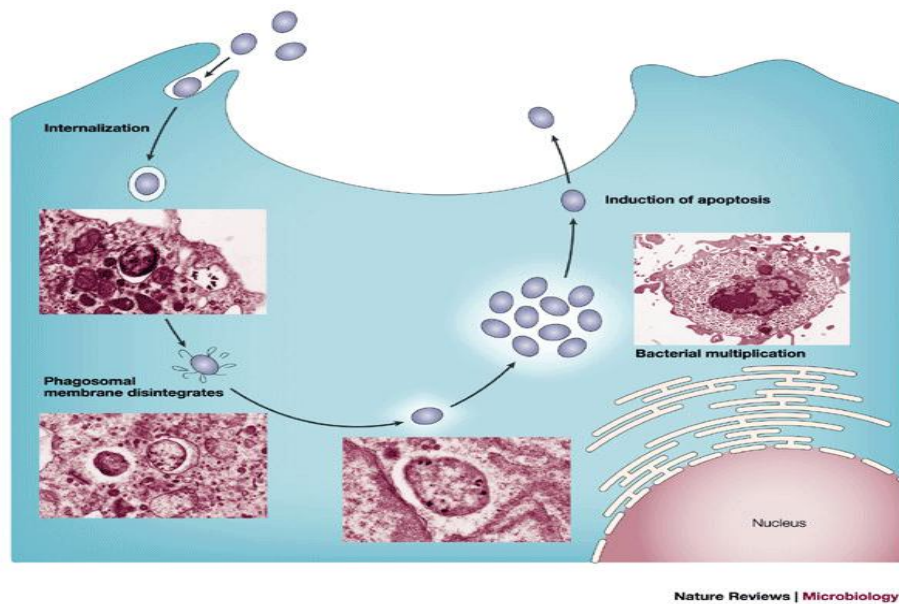


Figura 3: Fator de Virulência

Esta mobilidade baseada na Actina é essencial e exige a ActA codificada por um gene na região do gene da listeriolisina e os mutantes da ActA são avirulentos em ratos. Mecanismos de ação ActA, ao longo com outros componentes da mobilidade intracelular patogênica, estendem-se de célula a célula dos hospedeiros e tem sido extensivamente estudada como também a determinação da virulência através de altas inoculações ( $10^9$  a  $10^{10}$ ) de bactérias em ratos, provavelmente esclarece o que geralmente observa-se na reprodutibilidade das estimativas da virulência (KATHARIOU, 2002).

## Determinantes da Invasão Intracelular

Após a ingestão da *L. monocytogenes* pela via oral, ela coloniza o trato intestinal, invadindo os tecidos, incluindo a placenta em mulheres grávidas, e entra na

corrente sanguínea, por onde alcança outras células susceptíveis do corpo. Por ser um patógeno intracelular oportunista, ele deve primeiro penetrar em células susceptíveis e então iniciar um processo de replicação dentro dessas células, e em estudos mais intensos as proteínas de superfície, internalina A e a internalina B, tem diferencial exigido para a infecção em tipos diferentes de células reconhecendo os diferentes receptores nas células hospedeiras (KATHARIOU, 2002).

A associação de *L. monocytogenes* com esses receptores levam a fosforilação de várias proteínas de células hospedeiras e um complexo sinal em cascata resulta na internalização do microrganismo. Entretanto, os ratos transgênicos que abrigam um receptor funcional E-cadherin são muito mais sensíveis ao tipo selvagem de *L. monocytogenes* do que aos mutantes deficientes isogênicos de InlA, indicando um papel importante a presença da InlA na virulência *in vivo* (LECUIT *et al.*, 2001).

*L. monocytogenes* é considerado um patógeno oportunista, uma vez que a ocorrência de infecção depende principalmente das condições imunológicas dos indivíduos afetados (CRUZ *et al.*, 2008).

## **Dose Infectante e Período de Incubação**

A dose mínima infectante de *L. monocytogenes* não é conhecida e depende de vários fatores, tais como, diferenças de estirpes e a susceptibilidade do hospedeiro. Particularmente em indivíduos imunocomprometidos a dose é relativamente baixa entre  $10^2$  e  $10^4$  células (JAY, 2005).

Segundo a FAO (1999), a partir da análise de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*, para que ocorra infecção, é necessária a ingestão de contagens baixas

do microrganismo (inferiores a  $10^2$  UFC/g). Partindo-se desses achados, pode-se dizer que doses iguais ou maiores de  $10^2$  UFC de *L. monocytogenes*/g podem causar quadro de toxinfecção alimentar.

O Comitê de Higiene dos alimentos (CCFH), através da FAO/OMS (2009), considera três pontos específicos relacionados aos alimentos prontos para o consumo:

- Estimar o risco da doença, *L. monocytogenes* no alimento, quando o número de organismos variarem de ausência em 25g a 100 UFC por grama ou mililitro, ou não exceder níveis específicos no ponto do consumo;
- Estimar o risco da doença para consumidores em grupos suscetíveis da população (pessoas idosas, infantes, mulheres grávidas e pacientes imunodeprimidos) relativo à população geral;
- Estimar o risco da doença nos alimentos que suportam seu crescimento e alimentos que não suportam seu crescimento em condições específicas de armazenamento e do tempo de conservação.

Catão e Ceballos (2001) e Araújo *et al.* (2002) propõem a tolerância zero para a presença de *Listeria* em alimentos e a rígida adoção de técnicas preventivas de higienização, pois é justamente a capacidade de se sobrepor às condições ambientais que faz com que a *L. monocytogenes* seja atualmente de grande interesse na área de alimentos e explica o destaque que estes microrganismos vêm ocupando nos últimos

anos no controle de qualidade na indústria de alimentos, visto as dificuldades de sua eliminação.

Diferentes condutas são adotadas pelos países no que se refere aos limites de tolerância para a *L. monocytogenes*. O Brasil, por meio da Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da ANVISA, determina a ausência de *L. monocytogenes* em 25g em vários tipos de queijo. Nos Estados Unidos foi fixada tolerância zero, não sendo permitida a presença do patógeno em 25g de qualquer tipo de produto alimentício.

A Austrália requer a ausência de *L. monocytogenes* em cinco amostras de 25g de muitos queijos. A França determinou ausência de *L. monocytogenes* em amostras de 25g de alimentos para indivíduos de risco. Na Alemanha a tolerância zero é irreal, classificando os alimentos em quatro níveis de risco e fazendo o recolhimento dos que apresentarem crescimento  $> 10^4/g$  (JAY, 2005).

A Itália, na Conferência Internacional de Alimento Seguro, em 1995, considerou o risco da listeriose para alguns consumidores, classificando os alimentos em três grupos: I - alimentos para população de risco; II - alimentos aquecidos e acondicionados após tratamento; III - alimentos crus ou susceptíveis a re-contaminação após tratamento. E traçou como objetivo obter amostras de alimentos livres de *L. monocytogenes* em 25g de alimentos, entretanto quando não for possível tentar diminuir os níveis, tolerando 100 UFC por grama de alimento analisado (LAHELLEC, 1996).

O Canadá possui uma política que regulamenta a redução de riscos de contaminação por *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo com base no risco à saúde. Este regulamento baseia-se na combinação de inspeção, amostragem e testes de produtos com níveis de tolerância de 100UFC/g de alimentos (FARBER; HARWING, 1996).

O período de incubação da doença em adultos varia de uma a muitas semanas, dificultando a descoberta da fonte de contaminação no caso de surto da doença e está relacionado com a dose infectante do microrganismo e com a imunidade do hospedeiro (FARBER; PETERKIN, 1991). Podendo variar de três a noventa dias (KONEMAN *et al.*, 2001).

## **Listeria em Alimentos**

Segundo Koneman *et al.* (2001), a transmissão de *L. monocytogenes* nos alimentos é responsável pela maioria dos casos de listeriose epidêmica e esporádica, outras formas de transmissão também têm papel importante. De acordo com a literatura 32% dos casos esporádicos de listeriose são atribuídos ao consumo de água e alimentos contaminados (CRESPO *et al.*, 2009).

Em geral, o microrganismo parece ser capaz de sobreviver na carne processada mesmo após sofrerem tratamento durante o processo de industrialização. A refrigeração, a desidratação, a cura da carne e o empacotamento a vácuo parece não diminuir a infectividade desta bactéria (FARBER; PETERKIN, 1991).

Segundo Barretto *et al.* (2001), o maior risco de contaminação com *L. monocytogenes* provém da contaminação pós-processamento depois da cocção, quando não observados os cuidados necessários, no que se refere à manipulação de alimentos crus e mal cozidos, como é o caso de leite e produtos lácteos (queijos brancos), ovos, sorvetes, hortaliças (adubadas com fezes de animais), mariscos, mexilhões, carnes e produtos cárneos (fiambre, salsicha, embutidos) e, ainda, dos próprios manipuladores de

alimentos, onde os magarefes de matadouros têm sido reportados como portadores assintomáticos.

A *L. monocytogenes* já foi isolada de uma ampla variedade de alimentos, incluindo aves frescas e congeladas, carnes vermelhas e produtos à base de carne, pescado, produtos lácteos crus, como queijo e sorvetes, frutas e vegetais crus, além de fezes de pessoas saudáveis e sintomáticas, como também de animais (KONEMAN *et al.*, 2001).

No Brasil é muito comum o consumo de linguiças mistas do tipo frescal, produtos de origem animal que apresentam alta atividade de água e, por serem intensamente manipulados e não serem submetidos a tratamentos térmicos podem conter microrganismos patogênicos. Este produto, que têm grande aceitação de consumo, tem sido relacionado com surtos de toxinfecções alimentares, principalmente causados por fraco cozimento ou contaminação cruzada. É um produto muito perecível e que requer cuidado adicional para garantir a segurança alimentar (SILVA *et al.*, 2004).

Araújo *et al.* (2002), ressaltam que o aumento de surtos de listeriose humana a partir dos anos oitenta e a possível relação com alimentos contaminados vem preocupando as autoridades sanitárias. Segundo estes autores, são numerosos os casos individuais esporádicos de listeriose, provocados pela ingestão de produtos tais como, queijo macio, carne de frango mal cozida, salsicha inadequadamente reaquecida e alimentos provenientes de delicatessen. Ainda destaca, que a associação entre produtos derivados de carne e casos de listeriose nos países desenvolvidos indicam que os refrigerados e pratos prontos congelados e inadequadamente reaquecidos, podem constituir um risco para a saúde pública, que é potencialmente maior em produtos que não sofrem aquecimento antes da ingestão.

A listeriose ocorre tanto em epidemias de doenças transmitidas por alimentos como em casos esporádicos; cerca da quarta parte (23%) a quase três quartas partes (70%) das infecções causadas por *L. monocytogenes* em alimentos resultam em morte, sendo esta taxa maior do que a de outras enfermidades transmitidas por alimentos (KONEMAN *et al.*, 2001).

De acordo com o grupo de trabalho da OMS em listeriose de origem alimentar, a *L. monocytogenes* é um microrganismo ambiental, cuja transmissão ao homem se dá através de alimentos contaminados durante a produção industrial na planta de processamento (GRAVANI, 1999).

A presença de qualquer espécie de *Listeria* nos alimentos de origem animal é indicativa de condição higiênica deficiente da matéria prima, assim como, em alguma etapa do processo industrial. A coexistência de mais de uma espécie em um mesmo alimento é comum (LACIAR *et al.*, 2006).

## Listeriose

A listeriose é a denominação da doença causada em 98% dos casos pela *L. monocytogenes* e inclui septicemia, meningite (ou meningoencefalite), encefalite e infecção cervical ou intra-uterina em gestantes, podendo provocar aborto (no segundo ou terceiro trimestre) ou nascimento prematuro.

O primeiro caso identificado de listeriose humana ocorreu em 1929, na Dinamarca, estabelecendo-se a partir de então a correlação entre *L. monocytogenes* e meningite em humanos (MANTILLA *et al.*, 2007). Em 1966 verificou-se a transmissão desta bactéria através dos alimentos; a partir de então casos esporádicos de listeriose



começaram a ser observados em pessoas que mantinham contato com animais infectados (FARBER; PETERKIN, 1991). As ocorrências de casos de listeriose em sua forma neurológica têm aumentado consideravelmente no Brasil nos últimos anos (SCARCELLI; PIATTI, 2002).

A maioria dos casos de listeriose está associada aos indivíduos com comprometimento imunológico, como gestantes e seus fetos, neonatos, idosos, indivíduos HIV positivos. Nas pessoas que estão sendo submetidas a tratamentos quimioterápicos, o nível de mortalidade está entre 20 e 30%. Os casos em indivíduos saudáveis com idade adulta raramente são fatais, além de não existirem disponíveis dados confiáveis, uma vez que a grande maioria destes casos é diagnosticada como sendo uma simples gripe (OPHS, 2005).

A incidência anual de listeriose na Europa varia de 0,1 a 11,3 casos por milhão de habitantes, nos Estados Unidos, a incidência comunicada em 1992 foi de 7,4 casos por milhão de habitantes (KONEMAN *et al.*, 2001); somente no ano de 2006, foram registrados 138 casos de listeriose com uma taxa de incidência superior (0,31) a meta estabelecida pelo país (0,25); estima-se que o custo anual de casos agudos de listeriose seja de cerca de 2,3 bilhões de dólares (MEAD *et al.*, 1999).

A doença comumente é precedida por sintomas semelhantes aos da gripe com febre persistente. Sintomas gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia, podem preceder ou acompanhar as manifestações mais graves da doença, como meningite, meningoencefalite ou encefalite. Aborto, nascimento prematuro ou com o feto morto são consequências frequentes da listeriose em mulheres grávidas. Há relatos no Reino Unido de 46% de mortalidade entre crianças em estágio pré-natal e adultos (JAY, 2005).

## Surtos

A emergência de *L. monocytogenes* como patógeno alimentar data da década de 1980, com a ocorrência de diversos surtos e casos esporádicos de listeriose ligados a mudança de hábitos alimentares, como a maior ingestão de alimentos industrializados e ao consumo de alimentos contaminados (FARBER; PETERKIN, 1991; SILVA *et al.*, 2004; JAY, 2005) e tem provocado inúmeras discussões em todo o mundo, o que por sua vez tem estimulado pesquisadores a buscar respostas para as várias questões que têm surgido sobre a relação entre *Listeria* spp. e listeriose.

No Brasil e em alguns países não existem surtos de listeriose documentados causados por alimentos, entretanto, isto não significa que estejam livres deste problema emergente. O que vem ocorrendo é a subnotificação, uma vez que trabalhos publicados recentemente relatam à presença do microrganismo em alimentos, tornando-se uma preocupação devido à ingestão de produtos de origem animal ser considerada a principal fonte de transmissão para o homem (LOVETT; TWEDT, 1988; INTERLAB, 2002)

No Brasil trabalhos recentes relatam a presença da *L. monocytogenes* em produtos de aves (ARAÚJO *et al.*, 2006).

No período de fevereiro a junho de 1989, foram diagnosticados no Instituto de Saúde do Distrito Federal (ISDF) três casos de meningite bacteriana associada a *L. monocytogenes*, em pacientes recém-nascidos, uma criança e um adulto, sendo que este último resultou em óbito (HOFER *et al.*, 1998).

No Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), durante o ano de 2000, foram realizadas coletas de dez placentas provenientes de abortos ou partos prematuros.

A partir de análise microscópica e avaliação imunohistoquímica foi observado que 50% das amostras analisadas foram positivas para *L. monocytogenes* (SCHWAB; EDELWEIS, 2003).

Das duzentas e sessenta e seis amostras de material clínico humano, coletadas entre 1969 e 2000 em Pernambuco, Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, duzentas e quarenta e cinco foram identificados como *L. monocytogenes* isoladas de indivíduos com meningite purulenta (FONTOURA, 2006)

Em 2000, o CDC relatou que, de todos os patógenos em alimentos monitorados, a *L.monocytogenes* teve a segunda maior taxa de fatalidade (21%) e a maior taxa de hospitalização (90.5%).

No Canadá em 2008, um surto de listeriose, matou quatro pessoas e deixou dezessete hospitalizadas após consumir carne bovina contaminada pela *L. monocytogenes*. Tal fato provocou o fechamento da fábrica de Alimentos (Maple Leaf Foods), como também a retirada de vários carregamentos de carne que estavam prontos para ser enviados para os estabelecimentos comerciais (LUSA, 2008).

A maioria dos casos diagnosticados se concentra na Europa e Estados Unidos. Recentemente o número de casos informados vem aumentando, provavelmente devido a um melhor diagnóstico laboratorial juntamente com um aumento da população susceptível; além da alta prevalência da bactéria no ambiente e hábitos inadequados de manuseio, preparo e armazenamento dos alimentos (CRESPO *et al.*,2009).

Em estudo realizado na Austrália, com o objetivo de quantificar o risco no consumo de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*, pode-se estimar que 40%

dos casos foram relacionados às carnes processadas conforme dados epidemiológicos disponíveis (ROSS *et al.*, 2009).

## **Segurança Alimentar**

Conforme informações da ANVISA em 2006, no Brasil vêm sendo implantado, desde 1999, o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimentos e Água através do Centro Nacional de Epidemiologia do Ministério da Saúde. Por meio deste novo órgão se pretende colocar à disposição de todos os estados brasileiros os conhecimentos necessários relacionados aos principais problemas no tocante à saúde dos consumidores de alimentos industrializados.

Importante destacar que a qualidade dos alimentos tem sua importância cada vez maior devido também à globalização de mercados e queda das barreiras para o livre comércio internacional.

Segundo Roque-Specht (2002), a indústria alimentícia tem passado por vários avanços tecnológicos, relativos ao processamento e a conservação de alimentos, com vistas a conquistar mais mercados, tanto internos quanto externos. Assim, a segurança alimentar passou a ser um requisito exigido pelos consumidores, que estão atentos à qualidade do alimento.

Após sua contaminação na indústria de alimentos, a *Listeria* spp. dificilmente é eliminada e pode facilmente entrar na cadeia alimentar humana. Isso ocorre devido ao fato da grande capacidade dessa bactéria em formar biofilmes, que são complexos ecossistemas microbiológicos aderidos a um substrato e embebidos em uma

matriz de polímeros orgânicos. Grande parte da contaminação dos alimentos por essas bactérias ocorre durante o processamento dos alimentos (AUTIO *et al.*, 1999).

Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores, podendo comprometer assim, a qualidade microbiológica de matérias primas, produtos pré acabados e acabados (FUSTER-VALLS *et al.*, 2008).

Em função dos riscos inerentes a *L. monocytogenes* em alimentos de origem animal prontos para o consumo, o MAPA instituiu a IN nº 09, em 08 de abril de 2009, com o objetivo de monitorar e assegurar a inocuidade destes alimentos em estabelecimentos que possuem o SIF.

Neste contexto, entende-se que a detecção controle, por diagnósticos laboratoriais, da presença de agentes patológicos em amostras de alimentos é a ferramenta que permite o controle e prevenção de ocorrências de natureza epidemiológica e sanitária relacionadas ao consumo de produtos alimentícios.

### ***Listeria* spp. em embutidos**

Os estudos e procedimentos para isolamento e enumeração de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em alimentos têm aumentado muito nos últimos anos. As mudanças nas características e nos hábitos alimentares, a forma em que os alimentos são produzidos, a habilidade da *Listeria* de sobreviver em condições adversas, tornaram esse microrganismo emergente e de grande importância entre os patógenos transmitidos por alimentos e atualmente representa um grande problema para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação.

Silva *et al.* (2004) isolaram *Listeria* spp. em 100% das quarenta e uma amostras de linguiças mistas do tipo frescal analisadas em Pelotas/RS. Dentre as diferentes espécies, *L. innocua* foi isolada com maior frequência (97,6% das amostras) seguida por *L. monocytogenes* (29,3%) e *L. welshimeri* (24,4%).

Em estudo realizado por Coelho (1997), concluiu-se que durante o processamento de embutidos fermentados em Viçosa/MG, os fatores presentes tais como: temperatura, pH, dextrose, cloreto de sódio e nitrito de sódio, isoladamente não foram capazes de impedir o crescimento de *Listeria*.

De acordo com os resultados obtidos por Bersot *et al.* (2001), das trinta amostras de mortadela analisadas, onze (36,7%) foram positivas para *Listeria* spp., sendo oito (26,7%) para *L. monocytogenes*.

Araújo (2002) encontrou em 80% das amostras de *blanquet* de peru fatiado e em 90% das amostras de presunto de peru fatiado contaminação por *Listeria* spp. em Niterói/RJ. Destas, cinquenta e duas cepas eram *L. monocytogenes*, sendo 51,9%, 34,6%, 7,7%, 5,8%, pertencentes aos sorotipos 4b, 1/2c, 1/2b e 1/2a, respectivamente.

Comi *et al.* (1992) encontraram em cento e oitenta e nove amostras de salsichas comercializadas na Itália, vinte e sete (14,2%) amostras contaminadas por *L. monocytogenes*, onde na sorotipificação demonstrou que o sorotipo 4b foi o segundo mais identificado.

Em pesquisa realizada por Ichiro Sakate *et al.* (2003), em São Paulo foram detectadas três (6,7%) amostras positivas de *L. monocytogenes* em quarenta e cinco amostras de salame fatiado analisadas, sendo a população de 9,2 NMP/g para todas as amostras positivas.

Na determinação da prevalência de sorotipos de *L. monocytogenes* em cento e catorze amostras de linguiça mista do tipo frescal comercializadas em Pelotas/RS, foram encontrados 6,2% das amostras pertencentes ao sorotipo 4b, e 14% aos sorotipos 1a e 1b e 65,8% ao sorotipo 1c, em estudos de Araújo *et al.* (2007).

Mottin *et al.* (2006), detectaram 3,99 (13,3%) amostras contaminadas por *L. monocytogenes* dos trinta apesuntados de carne suína, fracionados e embalados e prontos para o consumo em Porto Alegre.

A ocorrência de *L. monocytogenes* foi avaliada em oitenta amostras de quatro diferentes tipos de salame fermentados em São Paulo (Friolano, Hamburguês, Italiano e Milano), sendo detectada em 13,3% das amostras de salame do tipo Italiano, enquanto que *L. innocua* ocorreu em 6,7% das amostras do tipo Italiano e 16,6% das amostras do tipo Milano. As demais amostras foram negativas para *Listeria* spp, conforme Borges *et al.*(1999).

No estudo realizado por Fai *et al.* (2007) em Fortaleza, das quarenta amostras de presunto suíno cozido sem capa de gordura analisados, foram constatados 42,5% de contaminação por *L. monocytogenes*.

A presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em salsichas fermentadas na Turquia foi detectado em sessenta e três (21%) e trinta e cinco (11,6%) respectivamente, em estudos de Colak *et al.* (2007).

Degenhardt e Santana (2007), pesquisando a presença de *L.monocytogenes* em trinta e uma amostras de embutidos cárneos coloniais (vinte salames e onze linguiças) produzidos no Vale do Rio do Peixe, Santa Catarina, detectaram a presença de *Listeria* ssp. em dezoito amostras (90,0%) de salames, sendo que quinze

apresentaram *L. innocua* (75,0%), duas *L. gray* (10,0%) e uma amostra *L. monocytogenes* (5,0%). Em linguiças, das onze amostras, cinco apresentaram-se positivas para *L. innocua* (45,4%).

## **Resistência Antimicrobiana**

As bactérias são classificadas em sensíveis, intermediárias e resistentes aos antimicrobianos, logo, o uso excessivo de antimicrobianos no tratamento e como medida profilática nos animais produtores de alimentos, acelera a emergência da resistência bacteriana e favorece a presença de resíduos de antimicrobianos nos alimentos e, conseqüentemente, a seleção de bactérias resistentes que podem ser transferidas aos humanos, comprometendo uma possível antimicrobianoterapia (MARTINS *et al.*, 2003).

As cepas de *L. monocytogenes* variam quanto à sensibilidade *in vitro* a diversos agentes antimicrobianos.

No estudo de Kasnowski (2004), todas as cepas analisadas foram resistentes a ampicilina, sendo este o fármaco de eleição no tratamento da listeriose. Entretanto foram encontradas cepas sensíveis a teicoplanina, vancomicina, cefalotina, gentamicina e tetraciclina.

De modo similar, Gonçalves (1998), em suas análises com peito de frango, observou cepas resistentes a antibióticos utilizados no tratamento da listeriose humana, sendo duas cepas resistentes ao cloranfenicol, três à ampicilina, duas à eritromicina e uma à tetraciclina.



Esses achados encontram respaldo na literatura, pela existência de plasmídios e transposons os quais conferem resistência a esses antimicrobianos e que podem ser transferidos de uma célula para outra. Esse fato, associado ao uso excessivo de promotores de crescimento e de antimicrobianos no tratamento de animais doentes e/ou como medida profilática, favorecendo a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos, acelerando a resistência bacteriana a antimicrobianos (FRANCO, 2002)

O efetivo tratamento da listeriose é usualmente baseado na administração de ampicilina ou penicilina associada à gentamicina ou a combinação sulfonamidas-trimetropim. É possível que as cefalosporinas, e talvez o cloranfenicol, sejam ineficazes para tratamento de pacientes imunossuprimidos com listeriose, embora as provas de sensibilidade a antimicrobianos *in vitro* possam sugerir que o isolado seja sensível. Até o momento não é possível considerar que *L. monocytogenes* seja sensível a tetraciclina, minociclina ou à trimetropina. A vancomicina é uma alternativa para o tratamento de pacientes com septicemia ou endocardite (KONEMAN *et al.*, 2001).

Em estudo de susceptibilidade antimicrobiana de *L. monocytogenes*, em alimentos na Grécia, as amostras foram susceptíveis para dezesseis antimicrobianos determinada pela diluição, exceto em uma amostra a qual apresentou resistência para tetraciclina (MIC > 32µg/ml). Esta amostra transporta o gene *tet* de resistência à tetraciclina (FILIOUSIS *et al.*, 2009).

Estudando a susceptibilidade antimicrobiana das quarenta e sete amostras de *Listeria* spp, isoladas de alimentos na Turquia, detectou-se resistência à penicilina (12,8%), cloranfenicol (8,5%), amicacina (4,3%), tetraciclina (2,1%), e cefaclor (2,1%), e sensibilidade ou intermediária para amoxicilina - ácido clavulânico, vancomicina,

gentamicina, ciprofloxacina, rifampin e sulfametoxalone-tripmetropim, (ARSLAN; ÖZDEMİR, 2008).

Alonso-Hernando *et al.* (2009), verificando a opinião dada pelo Comitê da União Européia, em que sugerem a existência de um potencial aumento da resistência antimicrobiana pelo uso de produtos descontaminantes, resolveram expor quatro cepas (*L. monocytogenes* sorovar 1/2a, *L. monocytogenes* sorotipo 4b, *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis*) ao aumento de concentrações sub-inibitórias de descontaminantes de fosfato trissódico (ácido clorídrico de sódio, ácido cítrico, dióxido de cloro ou ácido peracético) e testá-los contra quinze antibióticos por meio da norma técnica de disco difusão (NCCLS, 2009). Os padrões de resistência aos antibióticos foram comparados antes e após a exposição aos descontaminantes, observando-se um aumento da resistência à estreptomicina, cloranfenicol e cefalotina em cepas de *L. monocytogenes* após a exposição a produtos químicos, especialmente ácido clorídrico.

Em estudos de Pesavento *et al.* (2009), detectando a presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* e analisando a resistência a antibióticos em carnes cruas e alimentos vendidos a granel na Itália, observou-se a prevalência total de 11,7%, das quais o maior percentual de prevalência para *L. monocytogenes* foi encontrado em amostras de presunto (37,5%), enquanto que em salmões defumados e saladas prontas não havia contaminação. A sensibilidade das cento e sessenta e oito cepas de *Listeria* spp. foi determinada pelo método de difusão em disco, e foram encontradas cinquenta e uma (30,4%) estirpes resistentes a três ou mais antibióticos. Todas as estirpes isoladas, exceto uma, foram suscetíveis a pelo menos um dos antibióticos de primeira escolha (ampicilina e gentamicina) ou ao sulfametoxazol-trimetoprim, usado como antibiótico de segunda escolha no tratamento da listeriose humana. Cepas isoladas de alimentos

prontos para consumo mostraram alto nível de resistência à ampicilina, gentamicina e metecilina.

## **Embutidos**

Entende-se por "embutido" todo produto elaborado com carne ou órgãos comestíveis curados ou não, condimentado, cozido ou não, defumado e dessecado ou não, tendo como envoltório natural tripa, bexiga ou outra membrana animal (BRASIL, 1952).

A seleção dos ingredientes é uma etapa importante no processo tecnológico de elaboração de qualquer produto cárneo, já que as características organolépticas típicas dos produtos finais dependem de sua natureza e proporção. Tendo como matéria-prima exclusivamente carne bovina, ovina, suína e/ou de aves, gordura e outros tecidos. Preferem-se carnes de animais adultos para embutidos maturados e a de animais mais jovens para produtos cozidos por terem maior capacidade de retenção de água (ORDÓNEZ, 2005).

Segundo Pardi *et al.* (2007), mortadela é o produto de salsicharia de massa emulsionada, normalmente embutido em envoltórios naturais ou artificiais, elaborado à base de carne bovina e/ou suína, tratado por sais de cura, condimentado, defumado ou não e cozido por tempo proporcional ao seu volume e natureza, com sua temperatura interna devendo alcançar pelo menos 71°C.

Os embutidos são classificados:

- Embutidos Frescais: São produtos cárneos embutidos em envoltório natural e/ou artificial e conservados pelo frio.
- Embutidos Maturados: São produtos cárneos embutidos em envoltório natural e/ou artificial, curados, defumados e maturados por tempo de acordo com sua tecnologia, conservados em temperatura ambiente
- Embutidos Cozidos: São produtos cárneos embutidos em envoltório natural e/ou artificial, cozidos, defumados ou não, obedecendo a sua tecnologia e conservados pelo frio (DICKEL, 2009).

Os embutidos fermentados secos são os embutidos que tem no seu processamento a fermentação como medida para minimizar perdas, aumentar o sabor e a segurança dos produtos e não são submetidos a tratamento térmico. Desse modo, a segurança microbiológica e preservação desses produtos são dependentes da associação de vários fatores, incluindo baixa atividade de água, presença de cloreto de sódio e nitrito de sódio, baixo pH e presença de substâncias antimicrobianas adicionadas ou formadas durante o processamento (OLIVEIRA; MENDONÇA, 2004).

As matérias-primas utilizadas no preparo de salsichas e presuntos são as carnes mecanicamente separadas (CMS) de frango, carne suína e/ou carne bovina, miúdos e toucinho. Esses embutidos são considerados produtos cárneos cozidos e resfriados. E o fluxograma do processo consiste dentre outros, a adição de condimentos (sal, açúcar, pó de cebola e alho, etc), aditivos (nitrito/nitrato, polifosfato, eritorbato,

etc), etapa de cozimento a uma temperatura média de 80°C por trinta minutos até atingir uma temperatura no centro do produto de 71°C, esta etapa é seguida do resfriamento rápido, onde o produto sofre um choque térmico, depois segue para embalagem e estocagem entre 0 e 4°C (SEBRAE, 2000).

## **Metodologias utilizadas para isolamento de Listeria**

É necessário elaborar métodos sensíveis para a enumeração de *L. monocytogenes* a fim de determinar e quantificar a presença e o crescimento de níveis baixos (< 100/g) do microrganismo em alimentos preparados para o consumo e em amostras tomadas do ambiente (FAO, 2000).

### **Métodos Convencionais**

Segundo Silva *et al.* (1998), os meios de isolamento que têm sido desenvolvidos para a recuperação do patógeno, envolvem a combinação com um prévio procedimento de enriquecimento.

De acordo com Health Canada (2006), entre as metodologias mais indicadas para a detecção de *L. monocytogenes*, dependendo do nível de contaminação do alimento, são as que empregam um ou dois estágios de enriquecimento anterior ao plaqueamento.

Métodos tradicionais e métodos rápidos de detecção de Listeria utilizam uma etapa de enriquecimento da amostra para aumentar o microrganismo alvo, que pode estar em baixos níveis, injuriado ou subletalmente danificado (DONNELL, 2001;

SILK et al., 2002). Logo, a detecção do patógeno em produtos alimentares pode ser limitada pelo desempenho do meio de enriquecimento utilizado para a recuperação do microrganismo (SILK et al., 2002).

O enriquecimento seletivo, realizado em duas etapas (a primeira em caldo UVM, e a segunda em caldo Fraser), tem a finalidade de inibir a microbiota acompanhante, permitindo a recuperação de baixos números de células de *Listeria* spp. O efeito seletivo do caldo UVM é exercido pela associação de ácido nalidíxico e acriflavina, e no caldo Fraser pelo cloreto de lítio, ácido nalidíxico, acriflavina e citrato de ferro. O enegrecimento do meio evidencia a presença de *Listeria* spp. Após 48 horas de incubação, as culturas que não enegrecem, são consideradas negativas (DIFCO; BBL MANUAL, 2009).

Besse *et al.* (2010), ao estudar os fatores responsáveis pela velocidade de crescimento em meios de enriquecimentos pelas diferentes espécies de *Listerias*, verificaram que dentre vários fatores observados a competição nutricional pode ser um importante papel na inibição de crescimento de algumas espécies menos competitivas e apesar da *L. innocua* ter mais vantagens sobre a *L. monocytogenes* durante a fase de enriquecimento de cultura, não foi observado em seu estudo diferença significativa na produção entre essas duas espécies em caldo Fraser.

Outros procedimentos de enriquecimento têm sido usado, como o caldo de enriquecimento para *Listeria* da Merck. Segundo informes do Laboratório Merck (2006), este contém ácido nalidíxico e acriflavina como agentes seletivos, o caldo triptose adicionado de 2% de citrato de sódio.

Segundo Schwab *et al.* (2004), a incorporação de agentes seletivos e diferenciais a base de lítio aos meios de enriquecimento, os quais devem inibir o

crescimento de outros microrganismos que não a *Listeria*, mostrou-se vantajosa em relação ao enriquecimento a baixas temperaturas. O período de enriquecimento pode ser reduzido a poucos dias e a temperatura de incubação pode ser a ótima de crescimento do microrganismo.

Com o objetivo de avaliar os meios sólidos, pesquisadores têm desenvolvido diversos estudos enfocando a recuperação e contagem de *L. monocytogenes* em alimentos, utilizando-se o método de plaqueamento direto. Verifica-se que a eficiência dos meios de cultura depende do tipo de alimento analisado, da população de *L. monocytogenes* e da microbiota acompanhante (BRASIL, 2006).

Na seleção e isolamento em AP, observa-se a não fermentação do manitol e a formação de esculetina pela hidrólise da esculina, reação revelada pela presença de ferro trivalente. Palcam é meio sólido onde se encontram presentes as substâncias sulfato de polimixina B, cloreto de lítio, ceftazidina e cloridrato de acriflavina, com a finalidade da inibição da biota acompanhante. *L. monocytogenes* hidrolisa a esculina, dando como resultado a formação de um halo negro ao redor das colônias. Este agente não fermenta o manitol, o que o diferencia de contaminantes como *Enterococcus* e *Staphylococcus*. A incubação em condições microaerófilas inibe o desenvolvimento de aeróbios, como espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* que podem desenvolver-se sobre o meio (DIFCO; BBL MANUAL, 2009).

Em estudo realizado por Duarte (2005), durante a avaliação da sensibilidade do método analítico, demonstrou que os meios seletivos adotados (ATN e o ágar Oxford) foram capazes de promover o crescimento e a multiplicação de *L. monocytogenes* 4b a partir de um baixo número de células viáveis ( $10^2$ ) utilizadas para fortificação das amostras controle.

A alta velocidade de crescimento de *L. innocua* em meio líquido seletivo (Palcam e Oxford) comparado com *L. monocytogenes* pode resultar em um alto número de falsos negativos, quando em comparação com o meio LMBA detectando mais amostras positivas para *L. monocytogenes* que com os meios Palcam e Oxford. Em função de que no LMBA zonas hemolíticas se formam ao redor das colônias de *L. monocytogenes* distinguindo de outras espécies não hemolíticas como a *L. innocua* frequentemente presente em alimentos, reduzindo assim o tempo e material para confirmação (PINTO *et al.*, 2001).

Em trabalhos anteriores, Yokoyama *et al.* (1998), concluíram que a maioria das cepas de *L. innocua* produz uma bacteriocina que age contra a *L. monocytogenes*, podendo inibir o crescimento durante a cultura de enriquecimento.

Araújo (2002) explica que a identificação dos isolados é realizada através das características morfológicas e pela coloração da colônia de acordo com o meio de isolamento. São utilizadas as técnicas de coloração de Gram, motilidade celular, produção de indol, H<sub>2</sub>S, urease, catalase, e ácidos a partir de glicose, lactose e sacarose; redução do nitrato, fermentação de xilose, rhamnose e manitol com e produção de hemolisina, sendo que os resultados obtidos são comparados às características clássicas do microrganismo.

## **Métodos Rápidos**

De acordo com informações de Health Canada (2006), os métodos rápidos para isolamento da *L. monocytogenes* surgiram a partir da década de 70. Estes são resultantes de estudos que procuraram oferecer respostas à necessidade de se abreviar o



tempo para a obtenção de resultados analíticos e de se melhorar a produtividade laboratorial. Esses métodos também têm por objetivo simplificar o trabalho laboratorial, reduzir custos e aumentar a especificidade e sensibilidade própria dos métodos convencionais.

Em seu processo de produção de gêneros alimentícios as indústrias demonstram a necessidade de metodologias rápidas e sensíveis para monitorar a incidência de *L. monocytogenes*. As técnicas convencionais de isolamento e identificação de *Listeria* envolvem etapas trabalhosas de longa duração e, muitas vezes, consumindo semanas de enriquecimento e de cultivo em meios seletivos, o que é contrário à própria natureza de urgência do controle epidemiológico.

A bioMérieux possui um sistema de detecção simultânea e diferenciada num único teste de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* tanto para produtos alimentícios como para amostras ambientais, denominado teste VIDAS<sup>®</sup> LDUO, que se baseia no método ELFA, o qual consiste na captura do antígeno alvo através de anticorpos específicos tratados previamente que melhoram sua sensibilidade e especificidade, e um segundo anticorpo conjugado com uma enzima (alcalina fosfatase) fixa-se ao antígeno capturado e a detecção é dada pela intensidade da fluorescência interpretada pelo sistema.

O teste VIDAS<sup>®</sup> LDUO, combinado com o caldo de enriquecimento LX, permite um crescimento mais rápido das bactérias e uma melhor detecção que dá assim resultados superiores.

Fonte: bio-Mérieux

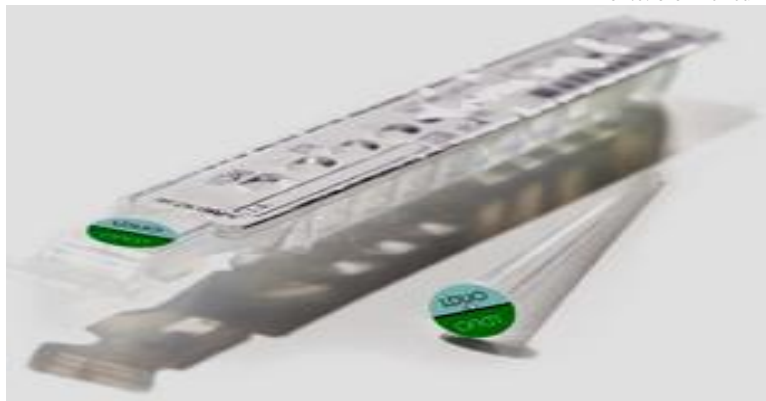


Figura 4: Barrete e Cone do kit VIDAS® LDUO

Outro método utilizado pela bioMérieux é o API Listeria, que é um sistema padronizado para a identificação de *Listeria* em 24h. Através de testes miniaturizados constituídos por dez microtubos contendo substratos desidratados que permitem verificar o desempenho enzimático ou fermentações de açúcares, através de padrões pré-estabelecidos. A diferenciação entre *L. monocytogenes* e *L. innocua* é baseada na presença ou na ausência de arylamidase (teste DIM) hidrólise da esculina, presença de amanosidase e produção de *D*-arabitol, *D*-xilose, *L*-ramnose,  $\alpha$ -mwtil-*D*-glicose, *D*-ribose, glicose- 1- fosfato e *D*- tagatose. Com este kit os testes de atividade hemolítica e ou reação de CAMP podem ser omitidos, reduzindo-se assim, consideravelmente, o tempo necessário para a identificação. Deste modo os resultados estão disponíveis entre 18 e 24 horas.

Foto: Anízia Lapenda, 2009



Figura 5: API Listeria

Paziak-Domanska *et al.* (1999), na Polônia, avaliaram em 46 amostras de *Listeria ssp.* isoladas de produtos cárneos, que no API teste a *L. monocytogenes* foi mais frequentemente identificada em carnes do que outras espécies de listéria e posteriormente conduzidas ao PCR para listeriolisina O apresentando amplificação para todas as amostras de *L. monocytogenes*.

Estudos revelam, portanto, que métodos rápidos servem como instrumento econômico e seguro para detectar bactérias contaminantes em alimentos nas indústrias.

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

---

ALONSO-HERNANDO, A. *et al.* Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. **Food Control**, v. 20, p. 1108–1111, 2009.

ARAÚJO, P. C. C. *et al.* Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em Produtos de Carne de Peru Comercializados na Cidade de Niterói-RJ-Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre: UFRS, p. 19-24, 2002.

ARAÚJO, M. R. *et al.* Prevalência de sorotipos de *Listeria monocytogenes* em Produtos Comercializados em Pelotas, BRASIL. **Higiene Alimentar**, v. 21, n. 150, p. 181, abr 2006.

ARSLAN, S.; ÖZDEMİR F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade White cheese. **Food Control**, v. 19, p. 360-363, 2008.

AUTIO, T. *et al.* Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing. **American Society for Microbiology**. v. 65, n. 1, p. 150-155, 1999.

BARBALHO, T. C. F. *et al.* Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, v. 16, n. 3, p. 211-216, mar 2005.

BARRETTO, E. S. S. **Listeriose**. 2001, Disponível em <<http://www.smsonline.rio.rj.gov.br/artigos.000627>>. Acessado em: 20 de maio 2009.

BERSOT, L. S. *et al.* Production of mortadella: behavior of *L.monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**, v. 57, p. 19-26, 2001.

BESSE, N. G. *et al.* The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis. **International Journal of Food Microbiology**. v.136, p. 345- 351, 2010.

**BIOMÉRIEUX Brasil**. Disponível em: <<http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/home>> Acessado em dez. 2009.

BORGES, M. F. *et al.* Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, out/dez 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/>

scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0001-37141999000400012>. Acessado em: 22 abr 2009.

BRASIL. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.** Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=14974>>. Acessado em: 16 maio 2009.

BRASIL, ANVISA. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.** Aprova o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>>>. Acessado em: 15 fev 2009.

BRASIL, MAPA. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003.** Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acessado em 17 abr 2009.

BRASIL, MAPA. **Instrução Normativa nº 09, de 08 de abril de 2009.** Institui os Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=19845>>. Acessado em: 03 maio 2009.

CDC. 2000. **FoodNet 2000. Foodborne Diseases Active Surveillance Network. CDC's Emerging Infections Program. 1999 surveillance results. Preliminary report.** CDC. 2001. **Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses – selected sites, United States, 2000. Morbidity and Mortality Weekly Report, [April 06, 2001] 50(13): 241-246.** Disponível em: <[www.cdc.gov/foodnet/annual/2000/2000\\_annual\\_report\\_foodnet.htm](http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2000/2000_annual_report_foodnet.htm)>. Acessado em: maio 2009.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. Coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios no Estado da Paraíba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas/SP, v. 21, n. 3, p. 281-287, set/dez

2001. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v21n3/8544.pdf>>. Acessado em 15 fev 2009

COELHO, C. P. **Efeito dos fatores presentes em embutidos fermentados e de culturas lácticas sobre *Listeria* spp. “in vitro”**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

COLAK, H. *et al.* Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). **Food Control**, v. 18, p. 30-32, 2007.

COMI, G. *et al.* ***Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products**. Letters in Applied Microbiology, v. 15, p. 168-171, 1992.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**, 2.ed., Rio de Janeiro: Medsi, 1992, 843p.

COURTIEU, A. L. Latest news on listeriosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v. 14, p. 1-7, 1991.

CRESPO, M.P. *et al.* **Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un Hospital de tercer nivel**. Disponível em: <<http://www.colombiamedica.univalle.edu.co/vol30no2/listeria.html>>. Acessado em maio 2009.

CRUZ, C. D. *et al.* *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 19, n.2, p. 195-206, abr/jun 2008.

DALLAS, H.L. *et al.* Virulence of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, and *Listeria innocua* assayed with in vitro murine macrophagocytosis. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 1, p. 24-27, 1995.

DEGENHARDT, R.; SANT’ANA E. S. Pesquisa de *Listeria* spp em embutidos cárneos fermentados produzidos na região meio-oeste de Santa Catarina, Brasil. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 133-140, jan./jun. 2007.

DICKEL, E. L. **Tecnologia de Embutidos** Disponível em: <[http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5217/material\\_didatico/AULA%20DE%20EMBUTIDOS.ppt](http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5217/material_didatico/AULA%20DE%20EMBUTIDOS.ppt)>. Acessado em 16 de maio de 2009.

**DIFCO & BBL Manual:** Demi-Fraser broth base; Fraser broth supplement. Disponível em: <[http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Demi\\_Fraser\\_Broth\\_Base.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Demi_Fraser_Broth_Base.pdf)>. Acessado em: 28. Dez. 2009.

\_\_\_\_\_: PALCAM medium base; PALCAM antimicrobial supplement. Disponível em: <[http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/PALCAM\\_Medium\\_Base.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/PALCAM_Medium_Base.pdf)>. Acessado em: 28. Dez. 2009.

DONNELL, Y. C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, v. 59, p. 183-194, 2001.

DUARTE, D. A. M. **Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijo coalho produzido e comercializado no Estado de PE**. Recife: UFRPE, 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.

FAI, A. E. C. *et al.* *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza/CE: fator de risco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva online**. 2007. Disponível em: <[http://www.abrasco.org.br/cienciaesaudecoletiva/artigos/artigo\\_int.php?id\\_artigo=2432](http://www.abrasco.org.br/cienciaesaudecoletiva/artigos/artigo_int.php?id_artigo=2432)>. Acessado em: abr 2009.

FAO/OMS. **Informe de La Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre La Evaluación de Riesgos Asociados a los Peligros Microbiológicos en los Alimentos**. Roma: FAO, 2000. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/july2000\\_es.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/july2000_es.pdf)>. Acessado em: maio 2009.

\_\_\_\_\_. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. **Microbiological risk assessment series**, n. 5. Roma: FAO/WHO, 2004. Disponível em <[http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra5\\_contents.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra5_contents.pdf)>. Acessado em: maio 2009

FARBER, J. M.; HARWING, J. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Food Control** v. 7, n. 4/5, p. 253-258, 1996. Disponível em: <<http://www.linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S09567135960000539>>. Acessado em: dez. 2009.



FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological reviews**. v. 55, n. 3, p. 476-511, set. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1943998>>. Acessado em: maio 2009.

FILIOUSIS, G. *et al.* Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria Monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 314-317, mar 2009.

FONTOURA, R. Estudo iniciado em 1969 traça panorama da listeriose no Brasil. **Notícias do Instituto Oswaldo Cruz**, 20.03.06. Disponível em: <[http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/noticia/2006/marco/20\\_03\\_06\\_01.htm](http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/noticia/2006/marco/20_03_06_01.htm)>. Acessado em: 24 abr 2009.

FRANCO, R. M. ***Escherichia coli*: Ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana**. Niterói: UFF, 2002. 153f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, 2002.

FUSTER-VALLS, N. *et al.* Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v.19, n.3, p. 308-314, 2008.

GONÇALVES, P. M. R. **Isolamento e identificação de *Listeria* spp. a partir de amostras de cortes de peito de frango congelados: avaliação de metodologia e fatores interferentes**. Niterói: UFF. 111f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, 1998.

GRAVANI, R. Incidence and control of *Listeria* in food-processing facilities. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**, 2.ed., p. 657-709, Nova Iorque: Marcel Dekker, 1999.

HEALTH CANADA. **Official Methods for The Microbiological Analysis of Foods**. 2006. Disponível em <<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analymeth/microbio/volume1/index-eng.php>>. Acessado em 05 mar. 2009.

HOF, H.; ROCOURT, J. Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in Food a health risk? **International Journal of Food Microbiology**, v.16, p.173-182, 1992.

HOFER, E. *et al.* *Listeria monocytogenes* meningites case reports in patients from three the Federal District. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 2, p. 173-177, mar-apr. 1998.

ICHIRO SAKATE, R. *et al.* Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **ALAN**, Caracas, Venezuela, v. 53, n. 2, p. 184-187, jun 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222003000200010&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222003000200010&script=sci_arttext)>. Acessado em 31 mar. 2009.

INTERLAB. *Listeria*: um inimigo silencioso. **Internews Industrial**, a. II, n. 3, 2002. Disponível em: <[http://www.interladist.com.br/ind\\_htm/internews\\_ind\\_3.htm](http://www.interladist.com.br/ind_htm/internews_ind_3.htm)>. Acessado em: 01 maio 2009.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KASNOWSKI, M. C. *Listeria spp., Escherichia coli*: isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. Niterói: UFF, 2004. 111f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, 2004. Disponível em: <[http://www.bdtd.ndc.uff.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=2599](http://www.bdtd.ndc.uff.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2599)>. Acessado em: 07 fev 2009.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety iperspective. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 11, p. 1811-1829, 2002.

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico**, 5.ed. Rio de Janeiro : MEDSI, 2001.

KREFT, J.; VASQUEZ-BOLAND, J. A. **Regulation of Virulence genes in Listeria**. *International Journal of Medical Microbiology*, v.291, p.145-147, 2001.

LABORATÓRIOS MERCK. **Manual Merck de saúde para a família**, s. 17, c. 177. Disponível em <<http://www.manualmerck.net/?url=/artigos/%3Fid%3D203%26cn%3D1625>>. Acessado em 07 fev 2009.

LACIAR, L. *et al.* DNA Fingerprinting by ERIC-PCR for Comparing *Listeria spp.* Strains Isolated from Different Sources in San Luis,Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**. v. 38, n. 2, jan.-abr. 2006 Disponível em <<http://www.scielo.org.ar/>>

scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0325-754120060002000 02>. Acessado em: 30 maio 2009.

LAHELLEC, C. *Listeria monocytogenes* in Foods: the French position International Food Safety Conference. *Listeria: the of the science-* 29-30 june 1995- Rome, Italy. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 241-243, 1996.

LECUIT, M. S. *et al.* A transgenic model of listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. **Science**, v. 292, p. 1722-1725, 2001.

LOVETT, J.; TWEDT, R. M. *Listeria*. **Food Technology**, v. 42, n. 4, p. 188-191, 1988.

LUSA – Agência de Notícias de Portugal. **Autoridades confirmam 21 casos de listeriose e atribuem causa a fabricante canadiano de charcutaria**. 24 ago 2008. Disponível em: <<http://tv1.rtp.pt/noticias/?article=149274&visual=3&layout=10>>. Acessado em: 24 abr 2009.

MANTILLA, S. P. S. *et al.* Ocorrência de *Listeria* spp. em Amostras de Carne Bovina Moída Comercializadas no Município de Niterói, RJ, Brasil. Comunicado. **Ciência e Agrotecnologia**. v.31, n.4, p.1225-1230, 2007.

MARTINS, S. C. S. *et al.* ‘Screening’ de linhagens de *E. coli* multiresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal do estado do Ceará, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p.71-76, jan/fev. 2003.

McCARTHY, S. A. Incidence and survival of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood products. **J. Food.Prot.**, Ames, v.60, n.4, p.372-376, 1997

MEAD, P.S. *et. al.* Food-related illness and death in the United Sates. **Emerging Infectious Disease** v. 5, n. 5, p. 607-625, set/out 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no5/mead.htm>>. Acessado em: 15 mar 2009.

MOTTIN, V. D. *et al.* Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp em embutidos de carne suína cozidos e fatiados comercializados em supermercados no município de Porto Alegre, RS. **Higiene Alimentar**, v. 21, n. 150, p. 191, abr 2006.

NCCLS. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por Disco-difusão: norma aprovada - oitava edição**, v. 23, n. 1. Disponível em:

<[http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas\\_public\\_disco\\_difusao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_disco_difusao.pdf)>. Acessado em: 01 maio 2009.

OLIVEIRA, K. A. M; MENDONÇA, R. C. S. Efeito da fermentação sobre a microbiota de embutidos cárneos. **Higiene Alimentar**, 18(123), 12-17, ago. 2004. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=394009&indexSearch=ID>>. Acessado em 27 maio 2009.

OPHS. **Office of Disease Prevention and Health Promotion**. 2005. Disponível em: <<http://odphp.osophs.dhhs.gov/>>. Acessado em: 12 abr 2009.

ORDÓNEZ, J. A. & Colaboradores. **Tecnologia de Alimentos- Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2 , 2005.

PARDI, M. C. *et al.* **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**, v. II, 2.ed. Goiânia: Ed. da UFG, 2007, p. 834-880.

PAZIAK-DOMANSKA, B. *et al.* Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, p. 209-214, 1999.

PESAVENTO, G. *et al.* Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. **Food Control**, 2009.

PINTO, M. *et al.* Comparison of Oxford Agar, Palcam and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from foods and environmental samples. **Food Control**, v. 12, p. 511-514, 2001.

RAMALHO, R. M. C.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., Coliformes Totais e Fecais, e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios no estado da Paraíba, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 21, n.3. p. 281-287, 2001.

ROQUE-SPECHT, V. F. **Desenvolvimento de um modelo de gerenciamento de Riscos para o aumento da segurança alimentar - estudo de caso em indústria de laticínios**. Florianópolis: UFSC, 2002. 156f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

ROSS, T. *et al.* Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats in Australia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2-3, p. 128-137, maio 2009.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M. Patógenos Emergentes Relacionados à Contaminação de Alimentos de Origem Animal. **Instituto Biológico**. v.64, n.2, p.123-127, jul/dez. 2002. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v64\\_2/scarcelli.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v64_2/scarcelli.pdf). Acessado em 30 maio 2009.

SCHWAB, J. P. *et al.* Identificação de *Listeria monocytogenes* pela técnica de imunohistoquímica em tecido nervoso central de ruminantes. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, Portugal, n. 99, p. 65-66, 2004.

SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M. I. A. Identification of *Listeria monocytogenes* in human placentas and abortion species through immunohistochemical technique. **J. Bras. Pat. Med. Lab.** V. 39, n. 2, p. 111-114, 2003.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Guia para elaboração do plano APPCC**, 2.ed. Brasília: Senai/DN, 2000. 301p.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A. (Ed). **Berguey's manual of systematic bacteriology**. 9th ed. Baltimore, USA: The Willians Wilkins Co., 1986. v. 2, p. 1235-1245.

SILK, T. M. *et al.* Comparison of growth kinetics for healthy and heat-injured *Listeria monocytogenes* in eight enrichments broths. **J. Food Protect.**, v. 65, p.1333-1337, 2002.

SILVA, M. C. D. *et al.* Avaliação de Métodos Para a Detecção de *Listeria* em Queijos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas/SP, v. 18, n. 2, p. 28-54, mai/jul 1998.

SILVA, W. P. *et al.* *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Br. **Ciência Rural**, Santa Maria/RS, v. 34, n. 3, p. 911-916, 2004

TODAR, K. *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **Todar's online textbook of bacteriology**. 2003. Disponível em <<http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>>. Acessado em: maio 2009.

VÁSQUEZ-BOLAND, J. A. *et al.* *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 14, jul. 2001. Disponível em <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88991>>. Acessado em: 30 mai 2009.

VITAS, A. I. *et al.* Occurrence of *L. monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v.90, n. 3, p.349-356, fev 2004.

YOKOYAMA, E. *et al.* Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p.133-137, 1998.

## **RESULTADOS**

---

Artigo:

---

**Detecção e perfil de sensibilidade antimicrobiana  
de *Listeria* spp. isolada em salsichas e presuntos  
resfriados comercializados em Recife - PE, Brasil**

---

Submetido:

*Revista International Journal of Food Microbiology*

---



## RESUMO

O objetivo desse estudo foi detectar a presença de *Listeria* spp. em especial *Listeria monocytogenes*, espécie patogênica ao homem e disseminada por alimentos. Foram analisadas 48 amostras de salsichas e presuntos resfriados de quatro marcas diferentes, sendo vinte e quatro amostras de salsichas tipo *hot dog* marcas A e B e vinte e quatro amostras de presuntos *lights* marcas C e D, comercializados a granel em mercados públicos e supermercados, nas seis Regiões Político Administrativas (RPA) da cidade do Recife, PE. Para a pesquisa utilizou-se o sistema qualitativo automatizado VIDAS<sup>®</sup> *Listeria* DUO da *bioMérieux*, que permite a detecção simultânea e diferenciada de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp, o que detectou 28 amostras positivas (58,33%) e o método convencional baseado na metodologia do MAPA, em sua instrução normativa nº 62 que apresentou 27 amostras positivas (56,25%) para *Listeria* spp., das quais 15 (53,57%) amostras foram confirmadas para *L. monocytogenes* o que representa, nas amostras totais, uma contaminação de 31,25%, indicando uma alta contaminação nos alimentos analisados e associados à alta sensibilidade pelo sistema VIDAS<sup>®</sup> LDUO. A sensibilidade antimicrobiana foi realizada através da técnica de disco-difusão preconizada pelo NCCLS e observou-se um perfil de sensibilidade aos antibióticos testados entre 92,6% a 100%, ficando apenas a Ciprofloxacina com perfil de 78%; apresentou-se ainda, em uma amostra de *L. monocytogenes* perfil de multiresistência a Vancomicina, Amoxicilina, Ampicilina e Ciprofloxacina.

**Palavras chaves:** *Listeria monocytogenes*; sistema VIDAS<sup>®</sup> LDUO; Sensibilidade a antimicrobianos; Técnica de disco-difusão; Salsichas; Presuntos.

## ABSTRACT

The aim of this study was to detect the presence of *Listeria* spp. in particular *Listeria monocytogenes*, a species pathogenic to humans and spread by food. We analyzed 48 samples of sausages and hams cooled from four different brands, and twenty-four samples of sausages hot dog brands A and B and twenty-four samples of hams lights marks C and D, sold in bulk in public markets and supermarkets in six Regions Political Administration (RPA) from the city of Recife, PE. For the research used the qualitative system automated VIDAS<sup>®</sup> Listeria DUO bioMérieux, which allows the simultaneous detection and differentiated from *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*, which detected 28 (58.33%) positive samples and the conventional method based on the methodology of MAPA (Ministry of Agriculture Livestock and Supply), in its normative n°. 62 had 27 (56.25%) positive samples for *Listeria* spp., 15 (53.57%) of which samples were confirmed for *L. monocytogenes* which represents, in all samples, a contamination of 31.25%, indicating a high contamination in foods analyzed and associated with high sensitivity by the VIDAS<sup>®</sup> LDUO. The antimicrobial sensitivity was performed using the technique of disk diffusion NCCLS and there was a profile of sensitivity to antibiotics tested between 92.6% to 100%, leaving only the profile of ciprofloxacin with 78%, presented yet, in a sample of *L. monocytogenes* profile of multidrug resistance to Vancomycin, Amoxicillin, Ampicillin and Ciprofloxacin.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; System VIDAS<sup>®</sup> LDUO; Antimicrobial sensitivity; Disk diffusion; Sausages; Hams.

## 1. Introdução

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva considerada por muitos autores como a única espécie patogênica para o homem e, conseqüentemente, a de maior importância para a saúde pública, devido à sua alta taxa de letalidade que varia de 20 a 50% dos casos, envolvendo principalmente gestantes, recém-natos e imunocomprometidos (MANTILLA *et al.*, 2007). No Brasil, nenhum foco foi relatado, contudo, vários estudos apontam a existência da *Listeria monocytogenes* em alimentos (FRANCO, 2005).

Bactérias do gênero *Listeria*, principalmente *L. monocytogenes*, também são utilizadas como indicadores higiênicos em todos os estágios da cadeia de processamento de alimentos. Esta bactéria pode sobreviver por longos períodos em alimentos, em plantas de processamento, em residências, ou no meio-ambiente, particularmente na refrigeração ou armazenadas em temperatura de congelamento. Pode ainda, ser detectada em embutidos fermentados secos e esse conjunto de características faz com que seja considerado um patógeno emergente de grande importância na área de alimentos (APHA, 2001; JAY, 2005).

A detecção de *L. monocytogenes* em embutidos pode ser decorrente da presença deste patógeno na matéria prima, sobrevivência ao processo tecnológico ou, ainda, devido à contaminação cruzada durante o processo de fatiamento (LATHI *et al.*, 2001).

Atualmente, no Brasil não existe um limite específico na legislação para a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, mas, apenas para queijos (BRASIL, 2001); entretanto, são considerados produtos de condições insatisfatórias

aqueles que demonstram a presença de microrganismos patogênicos (MANTILLA *et al.*, 2007).

Por ser um patógeno intracelular oportunista, tornou-se uma importante causa de infecção alimentar no mundo. Por isso, testes diagnósticos rápidos, específicos e sensíveis que possam diferenciar *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria* são importantes para o controle efetivo da listeriose (LIU, 2006).

O tratamento da listeriose é baseado na administração de antibióticos como: ampicilina ou associações de penicilina com gentamicina ou sulfonamidas com trimetopim. O uso da vancomicina é uma alternativa para o tratamento de pacientes com septicemia ou endocardite (KONEMAM *et al.*, 2001).

Embora a maioria dos isolados de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* serem sensíveis a antibióticos eficientes contra bactérias gram-positivas, a resistência tem sido relatada em isolados de casos clínicos esporádicos, alimentos ou ambiente (JAY, 2005).

Jalali (2008) afirma que o primeiro passo para convencer autoridades fiscalizadoras e a indústria privada da importância da *Listeria* em alimentos é fornecendo dados de ocorrência desta bactéria em vários tipos de alimento.

Considerando a importância deste patógeno para a saúde pública no contexto da segurança alimentar, sua frequente presença nos alimentos e pela necessidade de diagnósticos seguros com a finalidade de monitorar os produtos cárneos prontos para consumo, este trabalho teve por objetivo detectar a presença de *Listeria* spp., e traçar o perfil de sensibilidade antimicrobiana das amostras isoladas em embutidos resfriados comercializados a granel no município de Recife - PE, Brasil.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostras

Foram adquiridas quarenta e oito amostras de embutidos de quatro marcas distintas, sendo vinte e quatro amostras de salsichas tipo *hot dog* (marcas A e B) e vinte e quatro amostras de presuntos light (marcas C e D), comercializados a granel em mercados públicos e supermercados distribuídos nas seis Regiões Político-Administrativas (RPA) da cidade do Recife - PE, Brasil.

Todas as amostras foram produzidas em estabelecimentos sob Inspeção Federal e estavam dentro do prazo de validade indicado pelo fabricante.

#### 2.1.2. Colheita

As coletas foram realizadas durante os meses de outubro e novembro de 2009, onde cada amostra continha 300g, embaladas individualmente em sacos plásticos no próprio estabelecimento, acondicionadas em recipientes isotérmicos com gelo reciclável, e em seguida transportadas e mantidas sob refrigeração até o início das análises, que foram realizadas no LANAGRO/PE e no Laboratório de Inspeção de Carne e Saúde Pública da UFRPE.

Foram utilizadas como controle positivo nas provas de identificação, as cepas de *L. monocytogenes* (ATCC 19114) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), cedidas pelo setor de microbiologia de alimentos do LANAGRO-PE e a cepa de *Rhodococcus equi*, cedida pelo Laboratório de Bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFRPE.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1 Pesquisa

As análises foram realizadas seguindo-se o protocolo do sistema VIDAS<sup>®</sup> Listeria DUO (LDUO), da *bioMérieux*, e para o método convencional utilizou-se a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de 26 de agosto de 2003, que oficializa os métodos analíticos para pesquisa de *L. monocytogenes* em produtos de origem animal. Inicialmente, em uma cabine de segurança biológica, as amostras foram identificadas por código e pesadas assepticamente  $25\text{g} \pm 1\text{g}$  de cada (presunto e salsicha) em saco estéril.

### 2.2.2 Método Convencional

Para o enriquecimento seletivo cada amostra composta por  $25 \pm 1\text{g}$  foi homogeneizada com 225 ml do Caldo UVM (da DIFCO) por 2 minutos e incubadas em estufa bacteriológica a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h. Posteriormente foram pipetadas alíquotas de 0,1ml e adicionadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do Caldo Fraser (DIFCO) suplementado com 0,1ml da solução de citrato de amônio e ferro III a 5%, sendo incubados sob as condições acima citada.

Para o isolamento cada tubo contendo caldo Fraser foi semeado em placas com ATN DIFCO, e AP DIFCO, suplementadas com sulfato de Polimixina B e incubadas a  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h e 48h, respectivamente.

### 2.2.3 Método VIDAS<sup>®</sup>

As amostras foram homogeneizadas usando duplo enriquecimento, inicialmente com Caldo LX (enriquecimento primário) em *Stomacher* e incubadas a

30°C ± 1°C por 24h e posteriormente, foram aliqüotadas 0,1ml das amostras para tubos com Caldo LX (enriquecimento secundário) e incubadas a 30°C ± 1°C por 24h. Em seguida, foi retirada alíquota de 2ml da amostra em caldo LX para aquecimento a 95°C por 5 minutos; e posteriormente, 0,5ml de cada amostra foi inoculado no “barrete” e colocado no equipamento mini VIDAS<sup>®</sup> para realização do ensaio, que tem duração de 127 minutos, ocorrendo, ao término, a impressão do resultado.

Os resultados foram interpretados como ausência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*; ausência de *L. monocytogenes* e presença de *Listeria* spp.; ou, ainda, presença de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. As amostras positivas, a partir do caldo LX sem aquecimento, foram confirmadas através do repique em meios seletivos como AP e ATN, baseado na IN nº 62, do MAPA (BRASIL, 2003).

#### 2.2.4. Confirmação e Identificação do gênero

Três a cinco colônias suspeitas de *Listeria* spp. foram selecionadas e repicadas em tubos com Ágar Nutriente, incubados a 36°C ± 1°C por 24h e em seguida submetidas às provas de *Gram*, reação de catalase, prova de motilidade a ± 25°C, e os testes bioquímicos complementares através do API-*Listeria*<sup>®</sup> da *bioMérieux*, seguindo protocolo descrito pelo fabricante, o qual é composto das seguintes provas: DIM (teste diferencial entre *L. innocua*/*L. monocytogenes*), ESC (hidrólise da esculina), α-MAN (α-manosidase), DARL (acidificação do D-arabitol), XYL (acidificação da D-xilose), RHA (acidificação da ramnose), MDG (acidificação da α-metil-D-glucosidase), RIB (acidificação da ribose), G1P (acidificação da glicose-1-fosfato), TAG (acidificação da D-tagatose); fermentação de carboidratos manitol, ramnose e xilose; além dos testes de β-hemólise em Ágar sangue de carneiro a 8% e CAMP-teste em Ágar Columbia (BBL)

acrescido com ácido nalidíxico e 5% de sangue de carneiro desfibrinado, com *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi*.

As características fenotípicas e bioquímicas apresentadas pelas amostras foram comparadas com as características compatíveis com o gênero *Listeria* conforme (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características fenotípicas e bioquímicas utilizadas na discriminação de *Listeria* spp.

	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.ivanovii</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.welshimeri</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
Hemólise	+	+	-	-	+	-
CAMP-teste SA	+	-	-	-	+	-
CAMP- teste RE	v	+	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	+
Ramnose	+	-	v	v	-	-
Xilose	-	+	-	+	+	-
Gram	+	+	+	+	+	+

Fonte: BRASIL, 2003

### 2.2.5. Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Todos os isolados foram submetidos ao teste de antibiograma, utilizando a técnica de difusão em discos (BAUER *et al.*, 1966).

Os inóculos foram preparados em caldo Müller-Hinton e incubados a 37°C por duas a seis horas, ajustando-se a turbidez com a solução padrão de McFarland 0,5. Foram utilizados suabes estéreis para cada inóculo e semeado em toda superfície da placa contendo ágar Mueller-Hinton, deixando-os em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente os discos de antibióticos Glicopeptídeos - Vancomicina (30mcg) e Gentamicina (10mcg);  $\beta$ -lactâmicos - Ampicilina (10mcg) e Amoxicilina (10mcg); Macrolídeos - Eritromicina (15mcg) e Estreptomicina (300mcg); Tetraciclina (30mcg); Quinolonas e Sulfonamidas - Cotrimazina (25mcg) e Ciprofloxacina (5mcg) e Cloranfenicol (30mcg) foram distribuídos na superfície das placas e incubados a 37°C



por 16 a 18 horas. Em seguida, realizou-se a leitura com uma régua milimétrica, medindo-se o halo de inibição, que foi interpretado em sensível ou resistente de acordo com o NCCLS (2003).

Para a análise estatística dos dados seguiu-se as recomendações de Sampaio (1998) para o estudo da correlação entre as variáveis através do teste exato de Fisher com nível de significância de 0,05 e auxílio do programa Epi-Info, versão 6.04, sendo as tabelas e gráficos editados nos programas Word e Excel.

### 3. Resultados e discussão

Das quarenta e oito amostras analisadas pelo sistema VIDAS<sup>®</sup> LDUO, vinte e oito (58,33%) foram positivas, sendo detectada positividade simultânea para *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp.* em vinte e uma amostras (43,75%) e positividade só para *Listeria spp.* em sete amostras (14,58%). No método convencional, 27 amostras (56,25%) foram positivas para *Listeria spp.* (Tabela 2). Destas amostras, quinze amostras (53,57%) foram confirmadas para *L. monocytogenes*, dez amostras (35,71%) para *L. innocua* e duas amostras (7,14%) para *L. welshimeri*, ficando uma amostra de *Listeria spp.* positiva no sistema VIDAS<sup>®</sup> e não confirmada no método convencional. Estes resultados representam nas amostras analisadas um percentual de contaminação por *L. monocytogenes* de 31,25% e para *Listeria spp.* de 25% (Tabela 3).

**Tabela 2.** Detecção de *L. monocytogenes* e *Listeria spp.* pelo sistema VIDAS<sup>®</sup> e método convencional nas 48 amostras de embutidos analisados por RPA

RPA	VIDAS <sup>®</sup> LDUO			Convencional
	<i>Listeria spp.</i>	<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. spp.</i>	Total	<i>Listeria spp.</i>
I	4	3	7	7
II	1	4	5	4
III	1	4	5	5
IV	0	4	4	4
V	1	4	5	5
VI	0	2	2	2
Total	7 (14,58%)	21(43,75%)	28(58,33%)	27 (56,25%)

**Tabela 3.** Confirmação das amostras positivas de *Listeria* spp. isoladas de embutidos por Região Política Administrativa (RPA)

RPA	VIDAS® LDUO	Convencional		Confirmação	
	<i>Listeria</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. Monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>
I	7	7	2	4	1
II	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
III	5	5	3	1	1
IV	4	4	4	0	0
V	5	5	3	2	0
VI	2	2	1	1	0
Total	28 (58,33%)	27 (56,25%)	15 (31,25%)	10(20,83%)	2 (4,16%)

A alta ocorrência de *L. monocytogenes*, mesmo não havendo correlação com dados epidemiológicos de listeriose no Brasil, é preocupante e vem sendo relatada na literatura, em diferentes tipos de alimentos. Contudo, no estado de Pernambuco não há dados referentes à sua presença em embutidos. Outros trabalhos realizados no Brasil por Pettinati *et al.* (2006) verificaram a presença de *L. monocytogenes* em 218 (55,4%) das 394 amostras de salsichas tipo *hot dog* comercializadas na cidade de São Paulo; Borges *et al.* (1999) observaram que, dos 12 isolados positivos para *Listeria* spp., seis (50%) foram identificados como *L. monocytogenes* em 81 amostras de salames, na cidade do Rio de Janeiro; Fai *et al.* (2007) pesquisando *L. monocytogenes* em quarenta amostras de presunto cozido sem capa de gordura, constataram 42,5% de contaminação por este agente;

É importante salientar que a presença de espécie patogênica pode acarretar graves problemas à saúde pública, em especial às pessoas do grupo de risco, pelo consumo destes alimentos contaminados, uma vez que os presuntos são alimentos resfriados e normalmente consumidos sem nenhum tratamento térmico.

A presença de outras espécies de *Listeria*, não patogênicas para o homem, nas amostras analisadas é uma consequência dos procedimentos de sanitização inadequados, constituindo assim, um fator de risco em relação à segurança alimentar

(SILVA *et al.*, 2004, e NALÉRIO *et al.*, 2009). Também é um indicativo da possibilidade da presença de *L. monocytogenes*, desde que *Listeria* spp. habita o mesmo nicho ecológico (KARAKOLEV, 2009).

Dentre vários fatores observados na inibição de crescimento de algumas espécies menos competitivas, a competição nutricional pode ser um importante papel (BESSE *et al.*, 2010). A alta velocidade de crescimento de *L. innocua* em meios seletivos (Palcam e Oxford), quando comparado com o crescimento de *L. monocytogenes*, pode resultar em um alto número de falsos negativos (PINTO *et al.*, 2001); e estudos realizados por Yokoyama *et al.* (1998), concluíram que a maioria das cepas de *L. innocua* produz uma bacteriocina que age contra a *L. monocytogenes*, inibindo seu crescimento.

O não crescimento em meio sólido, de uma amostra positiva de *Listeria* spp. detectada pelo sistema VIDAS<sup>®</sup>, dentre as analisadas no RPA II, pode ser atribuída à existência de um baixo número de células viáveis presentes no inóculo e não cultiváveis em meio sólido conforme Duarte (2005). Também pode estar relacionado a fatores de estresse celular, (RYSER; DONNELLY, 2001) podendo ter seu crescimento inibido pela microbiota acompanhante.

Entre os embutidos analisados, verificou-se que as salsichas apresentaram os maiores índices de contaminação para *Listeria* spp. com 18,75% e 16,67% e para *L. monocytogenes* com 10,42% e 14,58% em mercados públicos e supermercados respectivamente. Já os presuntos apresentaram índices de 10,42% e 12,50% para *Listeria* spp. e 6,25% e 12,50% para *Listeria monocytogenes* (Tabelas 4 e 5). É importante destacar que grande parte da contaminação por essas bactérias ocorre durante o processamento dos alimentos (AUTIO, 1999), e provavelmente sua ampla

distribuição na natureza, contamine com frequência os alimentos (KONEMAN *et al.*, 2001), sobrevivendo em carnes processadas mesmo após sofrerem tratamento durante o processo de industrialização (FARBER; PETERKIN, 1991).

**Tabela 4.** Distribuição das amostras detectadas para de *Listeria* spp. em embutidos (salsichas e presuntos) de quatro marcas distintas (A, B, C e D) por RPA

RPA	Mercado Público				Supermercado			
	salsicha		presunto		salsicha		Presunto	
	A	B	C	D	A	B	C	D
I	+	+	+	+	+	+	+	
II	+	+				+	+	+
III	+	+		+		+		+
IV	+		+		+	+		
V		+	+		+		+	+
VI	+				+			
Total	9 (18,75%)		5 (10,42%)		8 (16,67%)		6 (12,50%)	

**Tabela 5.** Distribuição das amostras detectadas para *L. monocytogenes* em embutidos (salsichas e presuntos) de quatro marcas distintas (A, B, C e D) por RPA

RPA	Mercado Público				Supermercado			
	salsicha		presunto		salsicha		Presunto	
	A	B	C	D	A	B	C	D
I	+				+		+	
II		+				+	+	+
III		+		+		+		+
IV	+		+		+	+		
V			+		+		+	+
VI	+				+			
Total	5 (10,42%)		3 (6,25%)		7 (14,58%)		6 (12,50%)	

Verificou-se ainda, que entre as amostras analisadas dos supermercados quanto à presença de *L. monocytogenes*, os índices de contaminação foram superiores às amostras dos mercados públicos, contrariando estudos de que em mercados públicos, pelas condições precárias de instalações, equipamentos, confirmadas pela ausência das Boas Práticas de Manipulação, aliado na maioria pela presença de microrganismos, tornam-se importantes veículos de contaminação aos alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Analisando estatisticamente os resultados entre as amostras de salsichas quanto à presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em relação às marcas (A/B) e aos estabelecimentos (mercados públicos e supermercados), verificou-se que não houve diferença significativa ( $p = 0,500$ ), totalizando oito amostras positivas em cada estabelecimento. Fato também encontrado entre as marcas (C/D) de presuntos em relação à ocorrência nos estabelecimentos, totalizando seis e cinco amostras, respectivamente. Contrariando estudos de que a detecção da *Listeria* spp. pode ser decorrente também do processo de fatiamento, havendo um risco maior de contaminação cruzada (LATHI *et al.*, 2001) e a presença de qualquer espécie é indicativa de deficiente condição higiênica (LACIAR *et al.*, 2006).

No estudo da sensibilidade antimicrobiana nos 27 isolados de *Listeria* spp. demonstraram um perfil de sensibilidade entre 92,6% e 100%, frente às drogas utilizadas no tratamento da listeriose, e resistência a seis antibióticos (Vancomicina - 7,4%, Gentamicina - 3,7%, Amoxicilina - 7,4%, Cloranfenicol - 3,7%, Ampicilina - 7,4% e Ciprofloxacina - 11,1%) para os dez agentes testados. A Ciprofloxacina foi a droga que apresentou o menor perfil de sensibilidade antimicrobiana com 77,8%, enquanto que a Tetraciclina e Eritromicina apresentaram um perfil de sensibilidade de 100% para as amostras testadas (Tabela 6). Em geral os estudos de suscetibilidade de amostras de *Listeria* spp. apresentam sensibilidade a maioria dos antibióticos testados. Resultados semelhantes foram relatados por Arslan e Özdemir (2008). Analisando a sensibilidade em 47 amostras de *Listeria* spp., observaram resistência a Ampicilina (2,1%) e Cloranfenicol (8,5%), este sendo, o segundo mais resistente. Filiouis *et al.* (2009) estudando 30 amostras de *L. monocytogenes* isoladas de produtos cárneos, verificaram sensibilidade antimicrobiana a 16 antibióticos, entre eles a Eritromicina, observando resistência a Tetraciclina em apenas uma amostra. Nos estudos de

Pesavento *et al.* (2009) avaliando a sensibilidade antimicrobiana nas 168 amostras de *Listeria* spp. verificaram a sensibilidade em 99,4% das amostras a pelo menos um dos antibióticos de primeira escolha (Ampicilina e Gentamicina).

**Tabela 6.** Perfil de sensibilidade dos isolados de *Listeria* obtidos de embutidos resfriados comercializados no Recife, PE

Antibióticos	Nº de isolados (%)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Estreptomicina	-	1 (3,7%)	26 (96,3%)
Cotrimazol	-	1 (3,7%)	26 (96,3%)
Vancomicina	2 (7,4%)	-	25 (92,6%)
Tetraciclina	-	-	27 (100%)
Gentamicina	1 (3,7%)	1 (3,7%)	25 (92,6%)
Amoxicilina	2 (7,4%)	-	25 (92,6%)
Cloranfenicol	1 (3,7%)	1 (3,7%)	25 (92,6%)
Ampicilina	2 (7,4%)	-	25 (92,6%)
Ciprofloxacina	3(11,1%)	3 (11,1%)	21 (77,8%)
Eritromicina	-	-	27 (100%)

Ao analisar a distribuição da resistência frente às amostras de *L. monocytogenes* e *L. innocua* isoladas, verificou-se que as amostras de *L. monocytogenes* apresentaram o maior número de amostras resistentes, com cinco (18,5%) amostras, e a *L. innocua* com apenas uma (3,7%) amostra resistente, das quais uma amostra de *L. monocytogenes* (nº 23) apresentou multiresistência à Vancomicina, Ampicilina, Amoxicilina e Ciprofloxacina, sendo uma preocupação à Saúde Pública no controle da listeriose pelo uso excessivo de antibióticos na terapêutica e como medida profilática nos animais produtores de alimentos, podendo favorecer a resistência bacteriana e contribuir com a presença de resíduos de antimicrobianos nos alimentos e esta seleção a bactérias resistentes podem ser transferidas ao homem e a existência cada vez mais de microorganismos multiresistentes (MARTINS, 2003).

A Ciprofloxacina foi a droga que apresentou mais resistência para as duas espécies, seguindo da Vancomicina, Amoxicilina e Ampicilina com duas amostras

resistentes e Gentamicina e Cloranfenicol com apenas uma amostra resistente (Tabela 7).

**Tabela 7.** Avaliação da resistência as amostras de *L. monocytogenes* e *L. innocua* isoladas dos embutidos

Antibióticos	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
Estreptomicina	-	-
Cotrimazol	-	-
Vancomicina	(13, 23)	-
Tetraciclina	-	-
Gentamicina	42	-
Amoxicilina	23	14
Cloranfenicol	02	-
Ampicilina	23	14
Ciprofloxacina	(21, 23)	14
Eritromicina	-	-
Total de amostras	5 (18,5%)	1 (3,7%)

Esses achados encontram respaldo na literatura pela existência de plasmídios e transposons que conferem resistência a esses antibióticos podendo ser transferidos de uma célula para outra (FRANCO, 2002). Estudos na Grécia relataram uma baixa prevalência da resistência adquirida de *Listeria* em salsichas, contudo, a resistência a múltiplas drogas emergiu em um isolado clínico de *L. monocytogenes*, causando meningite em um recém-nascido (TSAKRIS *et al.*, 1997).

#### 4. Conclusão

A alta contaminação por *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* nos produtos embutidos analisados, considerando o processo de cozimento e que os mesmos foram manipulados nos estabelecimentos, representa uma preocupação a saúde pública, sugerindo falhas nos procedimentos de manipulação, higienização de equipamentos, utensílios e manipuladores como também na manutenção da cadeia de frios, necessitando uma melhor adequação das boas práticas e análise dos pontos críticos de controle, visando a oferta de alimentos seguros.

O sistema de diagnóstico VIDAS<sup>®</sup> Listeria DUO é uma ferramenta útil pela sua especificidade, sensibilidade e rapidez podendo auxiliar indústrias, órgãos fiscalizadores, laboratórios e toda a população no controle e prevenção deste agente nos alimentos de origem animal resfriados e prontos para o consumo.

As amostras de *Listeria* spp. isoladas dos embutidos demonstraram um perfil de sensibilidade antimicrobiana entre 92,6% e 100%, frente às drogas utilizadas no tratamento da listeriose, ficando apenas a Ciprofloxacina com perfil de 78%; apresentando em uma amostra de *L. monocytogenes*, parâmetro de multiresistência à Vancomicina, Ampicilina, Amoxicilina e Ciprofloxacina, sendo uma preocupação à Saúde Pública no controle da listeriose, pela existência cada vez mais de microorganismos multiresistentes.

### **Agradecimentos**

À bioMérieux pela doação dos kits VIDAS<sup>®</sup> (LDUO) para detecção de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, como também dos API-Listeria<sup>®</sup> para confirmação bioquímica dos isolados.

Ao LANAGRO, em especial a sua coordenadora, Dr<sup>a</sup> Diana Pinheiro, por contribuir na execução desta pesquisa.

### **Referências**

- APHA, 2001. **Compendium of methods of the microbiological examination of foods**. 4.ed. USA: APHA.
- ARSLAN, S.; ÖZDEMİR, F., 2008. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. **Food Control**. v.19, p.360-363.



AUTIO, T. *et al.*, 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing. **American Society for Microbiology**. v. 65, n. 1, p. 150-155.

BAUER, A. W. *et al.*, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496.

BESSE, N. G. *et al.*, 2010. The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis. **International Journal of Food Microbiology**. v.136, p. 345- 351.

**BIOMÉRIEUX Brasil**. Disponível em: <<http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/home>>. Acessado em 06 dez 2009.

BORGES, M. F. *et al.*, 1999. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, out/dez. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37141999000400012](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37141999000400012)>. Acessado em: 22 abr 2009.

BRASIL, ANVISA, 2001. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>>>. Acessado em: 15 fev 2009.

BRASIL, MAPA, 2003. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao?operacao=visualizar&id=2851>>. Acessado em: 13 abr 2009.

DUARTE, D. A. M., 2005. **Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijo coalho produzido e comercializado no Estado de PE**. Recife: UFRPE, 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

FAI, A. E. C. *et al.*, 2007. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza/CE: fator de risco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva online**. Disponível em: <<http://www.abrasco.org.br/>>

cienciaesaudecoletiva/artigos/artigo\_int.php?id\_artigo=2432>. Acessado em: 13 abr 2009.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological reviews**. v. 55, n. 3, p. 476-511, set. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1943998>>. Acessado em: maio 2009.

FILIOUSIS, G. *et al.*, 2009. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria Monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 314-317, mar.

FRANCO, R. M., 2002. **Escherichia coli: Ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana**. Niterói: UFF, 2002. 153f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense.

FRANCO, B. D. G. M., 2005. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu.

JAY, J. M., 2005. **Microbiologia de Alimentos**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed.

JALALI, M.; ABEDI, D., 2008. Prevalence of *Listeria* especies in food products in Isfahan, Iran. **International Journal of Food Microbiology**. v.122, p.336-340.

KARAKOLEV, R., 2009. Incidence of *Listeria monocytogenes* in beef, pork, raw-dried and raw-smoked sausages in Bulgaria. **Food Control**, v. 20, p.953-955.

KONEMAN, E. W. *et al.*, 2001. **Diagnóstico Microbiológico**, 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI.

LACIAR, L. *et al.*, 2006. DNA Fingerprinting by ERIC-PCR for Comparing *Listeria* spp. Strains Isolated from Different Sources in San Luis,Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**. v. 38, n. 2, jan.-abr. Disponível em <[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412006000200002](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412006000200002)>. Acessado em: 30 maio 2009.

LATHI, E. *et al.*, 2001. Survival and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. **Food Microbiology**. v. 18, p. 75-85.

LIU, D., 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**. v.55, p.645-649.

MANTILLA, S. P. S. *et al.*, 2007. Ocorrência de *Listeria* spp. em Amostras de Carne Bovina Moída Comercializadas no Município de Niterói, RJ, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 31, n. 4, p. 1225-1230.

MARTINS, S. C. S. *et al.*, 2003. ‘Screening’ de linhagens de *E. coli* multiresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal do estado do Ceará, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p.71-76, jan/fev.

NALÉRIO, E. S. *et al.*, 2009. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.3, p. 626-630, jul-set.

NCCLS, 2003. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por Disco-difusão: norma aprovada - oitava edição**, v. 23, n. 1. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas\\_public\\_disco\\_difusao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_disco_difusao.pdf)>. Acessado em: 01 maio 2009.

OLIVEIRA, R. B. A. *et al.*, 2008. Avaliação higiênico-sanitária dos boxes que comercializam carnes em dois mercados públicos da Cidade do Recife-PE/Brasil. **Medicina Veterinária**, Recife, v.2, n.4, p.10-16, out-dez.

PESAVENTO, G. *et al.*, 2009. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. **Food Control**.

PETTINATI, N. N. *et al.*, 2006. *Listeria monocytogenes* in Hot Dog Sausages Obtained from Groceries Stores in the City of São Paulo – A Comparative and Retrospective Analysis of Human Listeriosis Isolates. **Veterinária e Zootecnia**. v.13, n.2, p.182-191.

PINTO, M. *et al.*, 2001. Comparison of Oxford Agar, Palcam and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from foods and environmental samples. **Food Control**, v. 12, p. 511-514.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W., *Listeria*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K., 2001. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, c. 36, p. 343-363.

TSAKRIS, A. *et al.*, 1997. Neonatal meningitis due to multi-resistant *Listeria monocytogenes*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 39(4), 553-554.

SAMPAIO, I. B. M., 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: **Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 221p.

SILVA, W. P. *et al.*, 2004. *Listeria* spp. no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Br. **Ciência Rural**, Santa Maria/RS, v. 34, n. 3, p. 911-916.

YOKOYAMA, E. *et al.*, 1998. Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p. 133-137.

## **CONCLUSÃO GERAL**

---

O percentual de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. isolado nos embutidos analisados é bastante preocupante para a saúde pública, visto que pode acarretar graves problemas, em especial às pessoas do grupo de risco (idosos, crianças, imunocomprometidos), uma vez que esses produtos são consumidos sem nenhum tratamento térmico. Dessa forma medidas públicas de saúde devem ser tomadas para prevenir a proliferação desse patógeno, monitorando todas as etapas de produção desses alimentos nas indústrias e no comércio varejista, já que não se sabe onde se origina a contaminação.

Faz-se necessário ainda, a implantação de limites para a *L. monocytogenes* em alimentos cárneos resfriados prontos para o consumo, no intuito de se possibilitar uma maior garantia na oferta de alimentos de qualidade.

O sistema de diagnóstico VIDAS<sup>®</sup> Listeria DUO é uma ferramenta útil pela sua alta especificidade, sensibilidade e rapidez podendo auxiliar indústrias, órgãos fiscalizadores, laboratórios e toda a população no controle e prevenção deste agente nos alimentos de origem animal resfriados e prontos para consumo.

As amostras de *Listeria* spp isoladas dos embutidos demonstraram um perfil de sensibilidade entre 92,6% e 100%, frente às drogas utilizadas no tratamento da listeriose, apresentando em uma amostra de *L. monocytogenes*, parâmetro de multiresistência à Vancomicina, Ampicilina, Amoxicilina e Ciprofloxacina, sendo uma preocupação à Saúde Pública no controle da listeriose.

Considerando que todas as cepas de *L. monocytogenes* são patogênicas ao homem, novos estudos são necessários para identificar os sorotipos das amostras isoladas.