

MARIANA GOMES FERREIRA MACHADO DE SIQUEIRA

**Pesquisa de *Listeria* spp. em áreas de processamento em estabelecimentos
varejista de alimentos no Estado de Pernambuco, Brasil.**

Recife, PE

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

MARIANA GOMES FERREIRA MACHADO DE SIQUEIRA

**Pesquisa de *Listeria* spp. em áreas de processamento em estabelecimentos
varejista de alimentos no Estado de Pernambuco, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura

RECIFE

2013

Ficha Catalográfica

S619o Siqueira, Mariana Gomes Ferreira Machado de
Pesquisa de *Listeria* spp. em áreas de processamento em
estabelecimentos varejista de alimentos no Estado de
Pernambuco, Brasil / Mariana Gomes Ferreira Machado de
Siqueira. -- Recife, 2013.

51 f. : il.

Orientador (a): Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Medicina Veterinária, Recife, 2013.

Inclui apêndice e referência.

1. Boas práticas de fabricação 2. *Listeria monocytogenes*
3. Saúde pública 4. Supermercados I. Moura, Andrea Paiva
Botelho Lapenda de, Orientador
II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**Pesquisa de *Listeria* spp. em áreas de processamento em estabelecimentos
varejista de alimentos no Estado de Pernambuco, Brasil.**

Dissertação de Mestrado elaborada por

MARIANA GOMES FERREIRA MACHADO DE SIQUEIRA

Aprovada em 20/02/2013

Banca Examinadora

Profa. Dra. Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura
Orientadora – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE.

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE.

Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE.

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE.

Dedicatória

Aos meus pais, **Rosário** e **Frederico** (*in memoriam*), por existirem, estarem sempre comigo nas minhas caminhadas, acreditar, torcer e pela certeza do amor de vocês a mim.

Ao meu marido, **André**, pela sua compreensão e paciência e por ser essencial em minha vida.

Aos meus filhos, **Maria Teresa** e **Frederico**, a quem amo incondicionalmente, por serem razão de minha vida e por me proporcionar um dos sentimentos mais lindos que amor de mãe.

Aos meus irmãos **Fred** e **Igor** por estarem presentes em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço a *Deus* por me dar a maior dádiva divina, minha vida, e assim poder correr atrás de meus sonhos e realizar minhas conquistas. Obrigado Senhor por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, me dando serenidade para que eu possa enxergar o melhor caminho a seguir e por ser luz em minha vida.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência, compreensão, incentivo e apoio. Em especial a meu marido *André* e meus filhos *Maria Teresa* e *Frederico* que da forma deles, entenderam a minha ausência no processo de construção desse trabalho e mesmo assim estiveram sempre ao meu lado.

Ao meu cunhado e amigo *Daniel* por ser um anjo e me levado de volta à universidade.

A minha mãe *Rosário* por ser meu exemplo de vida e meu Pai *Frederico* por ter sido tão importante na minha e que me ensinou a doçura e inocência de se viver essa vida.

A minha sogra *Stella Maris* por estar sempre disponível para cuidar de minhas crias tão pequeninas.

Aos meus irmãos *Igor* e *Fred* que na medida do possível me ajudavam disponibilizando tempo para com meus pimpolhos.

À minha querida orientadora *Profa. Andréa Paiva Botelho Lapenda de Moura*, por se tornar minha amiga, acreditar em mim, me mostrando o sempre o caminho da verdade e da ética, fazendo parte da minha vida nos momentos bons e ruins, onde juntas trilhamos o desafio de se pesquisar e dividir momentos que nunca serão esquecidos e por ser exemplo de profissional.

Aos Professores *Jean Carlos Ramos da Silva*, *José Wilton Pinheiro Júnior* e *Rinaldo Aparecido Mota* pelo auxílio nos momentos críticos, por acreditarem nos resultados deste trabalho, pela contribuição para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido. O apoio de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

As Professoras *Andréa Alice*, *Fernanda Marvulo* e *Andréa Barreto* que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

A excelentíssima reitora e mãe *Maria José de Sena*, que mesmo de longe, acompanha minha caminhada pessoal e profissional me apoiando e incentivando.

A professora *Irineide Texeira*, quem me despertou para o caminho dos alimentos.

Ao amigo *Leandro* pela sua amizade e pela colaboração na construção dos resultados.

A amiga *Pomy* que desde sempre se mostrou disponível em colaborar com o trabalho e de fato colocando a mão na massa e vibrando comigo os resultados.

A amiga e “compa” *Monique* por ser uma entusiasmada pela vida, a quem poderei recorrer sempre que precisar.

A amiga *Anízia*, por ter me ensinado o senso de responsabilidade e comprometimento com aquilo que nos propomos a fazer, por ter sido sua “Isaurinha” e tomando o caminho da ciência sem ao menos me conhecer e ter sido a responsável pelo início do meu trabalho.

As amigas do Laboratório de Inspeção de Carne e Saúde Pública – LICASP, *Fernanda Lino*, *Fernanda*, *Maria Luiza* e a técnica *Goretti* pelos momentos que compartilhamos no laboratório sempre se mostrando disposta a ajudar no que for preciso.

Aos colegas dos laboratórios de Bacterioses e Inspeção de Leite por estarem sempre disponível para esclarecimentos e solicitações.

Aos colegas de turma do mestrado, em especial a *Joyce* por ter sido uma grata surpresa conhecê-la e pelos momentos juntas.

A coordenação do curso de Pós-graduação, *Tom (in memoriam)*, *Lana* e Professor *Hélio Manso Filho* pela disposição em atender todas as inúmeras solicitações e dúvidas sempre mostrando o melhor caminho.

A minha grande amiga e cumadre *Ana Cecília*, sempre presente em todos os momentos importantes de minha vida, como fonte de estímulo e apoio para toda a vida.

Aos amigos *Meliah* e *Aurelino* por auxiliarem no desenvolvimento desse trabalho e pela disponibilidade.

As amigas *Cynthya Cordeiro* e *Juliana Brito* pela oportunidade e compreensão pelos momentos de ausência.

As minhas primas queridas *Carla* e *Juliana* por estarem presentes em minha vida.

A *Guiomar* e *Cleide* pela disponibilidade, carinho, dedicação durante a realização desse trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde foi a casa a qual me formei médica veterinária e hoje finalizo mais um ciclo de vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de mestrado.

À 3M™ e Quiagen® pelo suporte material que foi disponibilizado para a realização desse estudo.

Enfim, toda a minha gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Epígrafe

“Saber não é tudo. É necessário fazer. E para bem fazer, homem algum dispensará a calma e a serenidade, imprescindíveis ao êxito, nem desdenhará a cooperação, que é a companheira dileta do amor”.

Emmanuel /Chico Xavier

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo isolar e identificar *Listeria* spp. em áreas de processamento de estabelecimentos varejistas de alimentos no estado de Pernambuco, Brasil. Para este estudo foram colhidas 86 amostras de *swabs* procedentes de equipamentos, utensílios e instalações utilizados para processamento de embutidos, distribuídas em dez estabelecimentos varejistas. Para identificação de *Listeria* spp. utilizou-se o método rápido 3M™, Quick Swab e 3M™ Petrifilm™. A confirmação de *Listeria monocytogenes* foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Nos estabelecimentos foi realizada uma lista de verificação para avaliar as condições higiênico-sanitárias dos pontos de coletas. Das 86 amostras analisadas, 27 (31,2%) [I.C. 21,81- 42,30%] foram positivas para *Listeria* spp. e destas, uma (3,7%) para *Listeria monocytogenes*. Os pontos de maior contaminação foram o piso (50,0%), placa de polietileno (42,9%) e faca (40,0%). Dos dez estabelecimentos analisados observou-se que oito (80,0%) tiveram ao menos uma amostra positiva para *Listeria* spp. Ao analisar a associação entre as condições higiênico-sanitárias dos pontos de coletas e exame microbiológico, foi constatado não haver diferença significativa ($p = 0,700$). Diante dos resultados obtidos conclui-se que a *Listeria* spp. está amplamente distribuída nos ambientes estudados o que pode favorecer a contaminação dos alimentos e conseqüentemente oferecer riscos à saúde pública. Desta forma, recomenda-se que parâmetros microbiológicos devem ser estabelecidos pelos órgãos reguladores de saúde para alimentos cárneos e seus embutidos com o intuito de oferecer um alimento seguro para os consumidores.

Palavras-chave: boas práticas de fabricação, *Listeria monocytogenes*, saúde pública, supermercados.

ABSTRACT

The aimed of this study was to isolate and identify *Listeria* spp. in processing areas of retail food stores in the state of Pernambuco, Brazil. For this study we collected 86 swabs samples from equipment, fixtures and facilities used for meat products processing, distributed in ten retail food stores. For the identification of *Listeria* spp. was used the 3M™ quick method, Quick Swab and 3M™ Petrifilm. The confirmation of *Listeria monocytogenes* was performed by the technique of Polymerase Chain Reaction in Real Time (qPCR). In the stores was made a checklist to assess the hygienic-sanitation conditions of the collection points. Of the 86 samples analyzed, 27 (31.2%) [I.C. 21.81 to 42.30%] were positive for *Listeria* spp. and of these, one (3.7%) for *Listeria monocytogenes*. The major points of contamination were the floor (50.0%), polyethylene plate (42.9%) and knife (40.0%). It was observed that of the ten stores analyzed, eight (80%) had at least one positive sample for *Listeria* spp. When analyzing the association between the hygienic-sanitation conditions of the collection points and microbiological analysis, we found no significant difference ($p = 0.700$). Based on these results it is concluded that the *Listeria* spp. is widely distributed in the areas that was studied, which may favor the food contamination and therefore present a risk for public health. Thus, it is recommended that microbiological parameters should be set by health regulatory agencies for meat and its meat products in order to provide a safe food for consumers.

Keywords: good manufacturing practices, *Listeria monocytogenes*, public health, supermarket

LISTA DE TABELA

		Página
Tabela 1	Pesquisa de <i>Listeria</i> spp. em diferentes ponto amostrais de áreas de manipulação de embutidos de estabelecimento varejista em Pernambuco, Brasil.	41
Tabela 2	Associação entre as condições higiênico-sanitárias e exame microbiológico de áreas de manipulação de embutidos de estabelecimento varejista em Pernambuco, Brasil.	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Resultado do qPCR para classificação de <i>L. monocytogenes</i> nas amostras positivas para <i>Listeria</i> spp.	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1.	Histórico.....	17
3.2.	Características da <i>Listeria</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i>	18
3.3.	Listeriose.....	20
3.4.	A regulamentação de parâmetros microbiológicos para <i>L. monocytogenes</i> em alimentos.....	22
3.5.	Alimentos prontos para consumo e boas práticas de fabricação de alimentos.....	23
3.6.	Métodos de identificação da listeria.....	25
3.7.	<i>Listeria</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i> em equipamentos e instalações.....	26
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
5	ARTIGO CIENTÍFICO - Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. em áreas de processamento em estabelecimentos varejista de alimentos no Estado de Pernambuco, Brasil.....	36
6	APENDICE A – Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos.....	52

1 INTRODUÇÃO

A busca crescente da praticidade destaca-se dentre as principais tendências de consumo de alimentos, pois em função da falta de tempo para o preparo das refeições, a característica praticidade tem sido cada vez mais, valorizada pelos consumidores, com isso, os alimentos pronto para consumo vêm ganhando espaço no cotidiano das pessoas (MARTINS, 2009). Além de nutritivos e bem aceitos sensorialmente, os alimentos comercializados devem ser seguros, em suas características físicas, químicas e microbiológicas, não oferecendo riscos à saúde do consumidor (PIRES, 2005).

Neste contexto destaca-se a *Listeria* spp., que é uma bactéria patogênica e se encontra amplamente distribuída na natureza, tendo sido isolada de uma grande variedade de locais e veiculada ao homem, principalmente, pelos alimentos. Dentre as oito espécies, a *L. monocytogenes* é a espécie patogênica para o homem e causa a listeriose, que é uma infecção alimentar severa, com uma alta taxa de mortalidade.

Em razão de suas características de patogenicidade e resistência a condições adversas, *L. monocytogenes* é um risco potencial para alimentos pronto para o consumo e consequentemente para a saúde pública (LAPENDA, 2010).

A presença de *L. monocytogenes* em áreas de processamento de alimentos pode ocorrer pela presença de resíduos de terra em calçados, por animais portadores ou que apresentem couro e superfícies contaminadas, por alimentos crus de origem animal e possivelmente por portadores humanos assintomáticos. (JEONG e FRANK, 1994).

A dificuldade em eliminar esse microrganismo das indústrias é potencializada pelas condições de umidade, temperatura e presença de matéria orgânica nas plantas de processamento, que aliadas à habilidade do patógeno em formar biofilmes, podem desencadear a colonização de superfícies de equipamentos e utensílios (SILVA et al., 2009).

Além disso, a higienização deficiente em equipamentos e utensílios têm sido responsável, isoladamente ou associado a outros fatores, por surtos de doenças de origem alimentar ou por alterações de alimentos processados (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Há relatos de que utensílios e equipamentos contaminados participam de aproximadamente 16% dos surtos (FREITAS, 1995).

Conhecendo-se a ampla distribuição da *L. monocytogenes* na natureza, sua patogenicidade, capacidade de sobreviver em alimentos refrigerados, resistência a tratamentos térmicos e importância em relação à saúde pública, torna-se necessária a realização de pesquisas no país para determinar a ocorrência desse microrganismo em toda cadeia produtiva de alimentos e a partir daí, estabelecer medidas eficazes de controle e controle da contaminação.

Diante do exposto, são poucas as pesquisas científicas relacionadas à presença de *Listeria* spp. em equipamentos, utensílios e instalações de estabelecimentos processadores de alimentos no Brasil. Também de acordo com a literatura consultada, na região nordeste, são escassos este tipo de estudo o que justificou a realização da pesquisa.

2 OBJETIVOS

- **Geral**

Pesquisar *Listeria spp.* em áreas de processamento de estabelecimentos varejista de alimentos no Estado de Pernambuco.

- **Específicos**

- Detectar a presença de *Listeria spp.* pelo método método rápido 3M™ Petrifilm™ para monitoramento de listeria ambiental;
- Classificar as espécies *Listeria spp.* isoladas em *L. monocytogenes* pela técnica de qPCR;
- Avaliar as condições higiênico-sanitárias e procedimentos de higienização dos estabelecimentos, através de *check-list* específico;
- Avaliar a associação entre as condições higiênico-sanitárias dos pontos de coletas e exame microbiológico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Histórico

Listeria monocytogenes é uma bactéria que foi descrita pela primeira vez por Murray e colaboradores no Reino Unido em 1926, como causa de uma infecção com monocitose em coelhos e cobaias infectadas em laboratório e denominada como *Bacterium monocytogenes*. Posteriormente, em 1927, foi renomeada como *Listerella hepatolytica* por Pirie que também isolou a bactéria em animais selvagens na África do Sul. Murray e Pirie percebendo que se tratava da mesma bactéria acordaram o nome *Listerella monocytogenes*. O atual nome foi dado em 1940 devido a razões taxonômicas por Pirei (FABER e PETERKIM, 1991; MANTILA et al., 2007; WAGNER e MCLAUHLIN, 2008).

Após descrição inicial, os primeiros isolados confirmados da bactéria, em indivíduos infectados foram feitos em 1929 por Gill proveniente de ovelhas e por Nyfeldt em humanos com mononucleose (FABER e PETERKIM, 1991).

Na década de 80 houve um crescimento no número de casos de listeriose em humanos e animais na América do Norte e Europa. Conjuntamente, surtos ligados ao consumo de alimentos contaminados levaram ao conceito que a listeriose era uma doença de transmissão alimentar. Mas essa concepção não é nova quando em 1926, Pirie já afirmava que doenças poderiam ser disseminadas através dos alimentos (WAGNER e MCLAUHLIN, 2008).

Para a saúde pública, a *Listeria* spp. foi reconhecida como agente patogênico após os surtos na década de 80 na América do Norte e Europa, com consequências sérias, invasivas e com risco de morte, além de alto prejuízo econômico tanto para os órgãos públicos quanto para as indústrias, que passaram a demandar maior atenção para o patógeno. Ao mesmo tempo se reconheceu o envolvimento e a importância dos alimentos na cadeia de transmissão da listeriose ao homem (FABER e PETERKIM, 1991; GERMANO e GERMANO, 2003; MANTILLA et al., 2007; WAGNER e MCLAUHLIN, 2008).

A *Listeria* spp. é o patógeno responsável pela listeriose que é uma doença transmitida por meio dos alimentos e seus surtos já foram bem documentados (JAY, 2005). Porém no Brasil, nos últimos 10 anos não houve notificação dessa doença (GERMANO e GERMANO, 2003; BRASIL, 2011).

3.2. Características da *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*

A *Listeria* spp. é uma bactéria Gram-positiva, bastonete curto, não formador de esporos, anaeróbias facultativas, com extremidades arredondadas, medindo 0,4 a 0,5µm de diâmetro por 0,5 a 2,0µm de comprimento e que não se coram pela coloração do ácido rápido. Possui caráter ubiquitário e por isso são encontradas amplamente no ambiente, tendo sido isolada de plantas, forragem, silagem, águas superficiais, esgotos domésticos, águas residuais de indústrias de laticínios e abatedouros, solos, adubo orgânico e em fezes de animais, inclusive de humanos. Também já foi encontrada em ambientes de elaboração de alimentos e os casos de surtos com esse microrganismo estão relacionados geralmente com os alimentos de origem animal prontos para consumo (JAY, 2005; RATTI, 2006; WAGNER e MCLAUHLIN, 2008; CODEX, 2009; D'OVIDIO, 2011).

Em relação as suas características bioquímicas, é catalase positiva, oxidase negativa, móvel a 20°C, fermenta a glicose produzindo, principalmente, ácido láctico, apresenta teste positivo para vermelho de metila e Voges-Proskauer. Não utiliza citrato exógeno, não produz indol e hidrolisa piruvato de sódio e esculina. Também não hidroliza uréia, gelatina e caseína (D'OVIDIO, 2011).

As necessidades nutricionais são comuns das bactérias Gram-positivas. O pH para a multiplicação está na faixa de seis a oito podendo crescer também entre 4,1 a 9,6. Apresenta crescimento na faixa de 3°C a 45°C classificando a como psicotrófica, podendo suporta repetidos congelamentos e descongelamentos (GERMANO e GERMANO, 2003; JAY, 2005; CARPENTIER E CERF, 2011).

De acordo com Franco e Landgraf (2002), no que diz respeito à concentração de NaCl, *Listeria* spp. sobrevive a uma concentração entre 10,5% a 13% quando incubados a 37°C, porém quando submetidos a uma temperatura de 4°C em concentrações variando de 10,5% a 30,5%, apresenta uma sobrevivência acima de 100 dias.

A atividade de água ótima para crescimento é próxima a 0,97, porém esse agente tem a capacidade de multiplicar-se em valores próximos a 0,92, que é considerado um valor muito baixo para o desenvolvimento de patógenos veiculados por alimentos (JAY, 2005; D'OVIDIO, 2011).

Atualmente há oito espécies reconhecidas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii* e *L. rocourtiae*. Destas *L. monocytogenes* é um

patógeno oportunista para humanos e *L. ivanovii* para outros mamíferos. Porém, já foram descritos casos isolados de *L. seeligeri* e *L. ivanovii* como causa de doenças em humanos (HANSBRO, 2005; GUILLET, 2010; BARBUDDHE, 2012).

L. monocytogenes é a principal espécie do gênero envolvida em enfermidades em seres humanos, porém as demais espécies são relevantes por apresentarem características semelhantes a esta espécie e com isso sua identificação podem ser considerada como indicador da presença de *L. monocytogenes* (SILVA, 2009).

São 12 os sorotipos de *L. monocytogenes* envolvidos em surtos de doenças, entretanto, 95% das cepas isoladas de casos de listeriose humana são de três sorotipos: 1/2a, 1/2b e 4b. A ocorrência destes sorotipos em casos de doenças tem sido documentada em pesquisas em diferentes países. Vários surtos de listeriose indicaram alta ocorrência do sorotipo 4b, variando de 50 a 70%; por outro lado, estudos sugeriram que o 4b não é o principal sorotipo isolado em alimentos (JAY, 2005). Essa discrepância entre a ocorrência da bactéria no alimento e a ocorrência da doença pode sugerir que o sorotipo 4b é o mais virulento que os demais sorotipos (KATHARIOU, 2002).

L. monocytogenes é um microrganismo que exige atenção em locais de processamento de alimentos, devido a algumas particularidades que propiciam sua ocorrência, dentre as quais se pode destacar a ubiquidade, a sobrevivência no ambiente mesmo em condições adversas, e com o mínimo de nutrientes, a capacidade de multiplicar-se sob temperaturas de refrigeração, tolerância a altas concentrações de sal e pH relativamente baixo (MARTINS, 2009).

L. monocytogenes tem a habilidade de produzir biofilme e sobreviver por vários meses em ambientes processadores de alimentos. A estrutura do biofilme protege o microrganismo de fatores físicos (esfregação) e químicos (sanitizantes e detergentes). O processo de formação de biofilme não é bem esclarecido, mas tem-se mostrado que as diferentes cepas de *Listeria* spp. tem variação na sua capacidade de formação do biofilme (CRUZ et al., 2011). Segundo Carpentier e Cerf (2011), as espécies de *L. monocytogenes* são recorrentemente encontradas nas superfícies de indústrias de alimentos, em particular em ambientes refrigerados, apesar de serem limpos e desinfetados.

3.3. Listeriose

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorrem pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com microrganismos patogênicos que afetam a saúde do consumidor em forma individual ou coletiva (FLORES, 2005).

A listeriose é uma importante DTA causada pela *L. monocytogenes* que se apresenta como patógeno de mais de 50 mamíferos, incluindo o homem, além de aves silvestres, peixes e crustáceos (JAY, 2005). Os animais são importantes no ciclo epidemiológico da listeriose em humanos, pois favorece a manutenção do patógeno no ambiente por meio da contaminação fecal da água, solo, vegetação, pastagem. (D’OVIDIO, 2011).

Essa enfermidade nos seres humanos apresentam sintomas que incluem septicemia, meningite (ou meningoencefalite), encefalite, infecção cervical ou intrauterina em gestantes, as quais podem provocar aborto (no segundo ou terceiro trimestre) ou nascimento prematuro. Outras manifestações que podem ocorrer são endocardite, lesões granulomatosas no fígado e outros órgãos, abscessos internos ou externos, lesão cutânea papular ou pustular. Essas desordens geralmente são precedidas por sintomas semelhantes ao da gripe com febre persistente. Gastroenterites com náuseas e vômitos podem preceder ou acompanhar as manifestações mais graves da doença (GERMANO e GERMANO, 2003; JAY, 2005; D’OVIDIO, 2011).

Ocorrem principalmente em pessoas pertencentes aos grupos de risco, tais como gestantes, crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos, devido à utilização de medicamentos como corticosteroides, drogas para câncer, para transplantados; pacientes com leucemia, câncer e Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (SIDA); diabéticos, cirróticos, asmáticos e os com colite ulcerativa; idosos e pessoas normais fazendo uso de antiácidos ou cimetidina (JAY, 2005; MARTINS, 2009). O risco de infecção pela *L. monocytogenes* de uma gestante para uma mulher saudável é de 14 vezes, justificado pela diminuição do sistema imunológico que naturalmente acontece nas gestantes (MARTINS e GERMANO, 2011).

O período de incubação é longo, podendo variar de três a 90 dias, o que dificulta a identificação do patógeno e o rastreamento para a identificação do alimento contaminado que tenha causado a doença (FORSYTHE, 2002; MARTINS e GERMANO, 2011).

A transmissão da listeriose para o homem pode ocorrer principalmente por intermédio de alimentos como derivados lácteos, leite cru ou pasteurizado, sorvete e queijos, bem como

produtos cárneos crus ou processados de várias origens (bovinos, caprinos, ovinos, aves), peixes, embutidos e os alimentos prontos para consumo; incluindo também produtos de origem vegetal. Vale ressaltar que o microrganismo pode ser eliminado no leite de animais infectados. Porém, outras vias também são descritas como: o contato direto com animais doentes ou assintomáticos, pelo contato do neonato com o canal do parto, por transplantes de órgãos, além de infecções hospitalares não relacionadas a alimentos, geralmente em berçários (KATHARIOU, 2002; JAY, 2005; LIU, 2008; D'OVIDIO, 2011).

O diagnóstico é feito pela identificação dos sinais clínicos e sintomas; do isolamento bacteriano de material clínico como sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, fígado, baço, placenta e feto. A identificação também pode ser feita por imuno-histoquímica e achados histopatológicos (D'OVIDIO, 2011).

A importância da listeriose em saúde pública diz respeito à gravidade da manifestação clínica, resultante do comprometimento do sistema nervoso central e pela infecção acometer preferencialmente as gestantes com graves consequências aos fetos. As taxas de mortalidade podem chegar a 70% nos casos de meningite, 50% nos casos de septicemias e exceder 80% nos casos de infecção neonatal (GERMANO e GERMANO, 2003; MARTINS e GERMANO, 2011).

Surtos de listeriose já foram relatados em diversas localidades incluindo países da América do Norte e da Europa (CRUZ et al., 2008). De acordo com CDC (2011), no período de 1998-2008, em média 2,4 surtos por ano foram notificados. Antes de 2011, o maior surto ocorreu em 2002, quando 54 pessoas adoeceram com oito mortes de adultos e três mortes fetais associados com o consumo de presunto de peru.

A ocorrência de listeriose de origem alimentar é relatada principalmente em países industrializados, com poucos, ou nenhum relato em países em desenvolvimento (CRUZ et al., 2008). Entretanto, não se sabe se isto reflete diferentes taxas de exposição, hábitos alimentares e susceptibilidade do hospedeiro ou se falta de sistemas de pesquisas e informações de dados (OVÍDIO, 2001).

Alguns relatos sobre a ocorrência de listeriose no homem têm sido feitos no Brasil. Foram analisadas 225 amostras do gênero *Listeria* isoladas de material clínico humano de várias regiões do país no período de 1969 a 2000 e a maior prevalência foi de *L.monocytogenes* do sorotipo 4b (HOFER et al.,2006). Também no Estado de São Paulo

foram relatados dois casos de peritonite bacteriana espontânea por *L. monocytogenes* em pacientes com cirrose (TOYOSHIMA et al., 2006).

Apesar de muito se ter compreendido nos últimos anos sobre a listeriose devido à ocorrência de surtos, a maioria dos casos de listeriose humana ocorrem esporadicamente. Porém esses casos são difíceis de estimar devido à subnotificações (PITA, 2012). Em seu estudo, Mead et al. (1999) afirmaram que o número real de casos de listeriose equivale a duas vezes o número de casos notificados nos Estados Unidos da América (EUA).

3.4. Regulamentação de parâmetros microbiológicos para *L. monocytogenes* em alimento.

Alguns países estabeleceram limites legais para o nível de contaminação de microrganismo permitido em alimentos, especialmente para os produtos prontos para consumo, enquanto outros países têm sugerido procedimentos ou critérios que não tem amparo legal (JAY, 2005).

Os EUA adotaram a política de “tolerância zero”, de modo que a presença da *L. monocytogenes* em 25g de qualquer tipo de alimento pronto para consumo é considerada inaceitável, caracterizando-o como impróprio para consumo humano (MARTINS, 2009).

Já a comissão da Comunidade Europeia, pelo do Regulamento CE 2073 (2005), alterado em dezembro de 2007 pelo Regulamento CE 1441 (2007), estabeleceu que para os alimentos prontos para consumo a detecção deste patógeno deve ser inferior a 100 UFC/g. Este parâmetro aplica-se aos produtos colocados no mercado em toda a sua vida útil e para alimentos não suscetíveis ao crescimento da *L. monocytogenes*. Observa-se que, no caso dos produtos susceptíveis, existe também o critério de ausência em 25g na saída do processamento (MARTINS, 2009).

Na regulamentação canadense, os critérios estabelecidos para os alimentos prontos para consumo estão dentro de duas categorias, com base no risco para a saúde. A categoria 1 contém produtos em que o crescimento de *L. monocytogenes* pode ocorrer. Estes devem receber a mais alta prioridade para a verificação da indústria e controle, bem como atividades de regulação de fiscalização e cumprimento. A categoria 2 contém dois subgrupos: 2A) produtos alimentares pronto para consumo em que não limita o crescimento de *L. monocytogenes* em níveis superiores a 100 UFC / g, podendo ocorrer ao longo do referido

prazo de validade; e 2B) produtos alimentares em que o crescimento de *L. monocytogenes* não pode ocorrer durante o tempo de vida útil desse alimento (HEALTH CANADA, 2011).

No Brasil, os padrões microbiológicos para alimentos, estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº12, de 2 de janeiro de 2001, definiu a ausência de *L. monocytogenes* em 25g somente para alguns queijos. Para os demais alimentos não são contemplados limites específicos para essa bactéria (BRASIL, 2001).

3.5. Alimento pronto para consumo e as boas práticas de fabricação

Alimento pronto para o consumo (APC) é todo alimentos que normalmente se ingere cru ou que foi manipulado, elaborado, cozido ou preparado de outra forma e que não sofrem nenhum tipo de cocção ou etapa posterior desse preparo que elimine algum tipo contaminação antes do seu consumo (CODEX, 2009).

Um importante aspecto a ser considerado dentre as novas perspectivas do mundo globalizado é a mudança de hábitos alimentares das populações, principalmente em países desenvolvidos, onde a busca por praticidade é cada vez maior e com isso alimentos prontos para o consumo, que tem sua produção aumentada e conseqüentemente os riscos de surtos de origem alimentar (MARTINS E GERMANO, 2011).

Dentre os APC os mais consumidos são os alimentos fatiados e o aumento de demanda desses produtos se dá pela conveniência e a boa aceitação por grande parte dos consumidores (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2010). Essa crescente demanda de produtos industrializados e minimamente processados tem contribuído para o aumento dos riscos de doenças transmitidas por alimentos. Com isso também tem aumentado a preocupação por parte das indústrias e dos órgãos fiscalizadores para o controle da *L. monocytogenes* (GERAMANO E GERMANO, 2003; FAI et al., 2011).

A contaminação cruzada, ou seja, o contato dos alimentos prontos para consumo com superfícies o utensílios contaminados com micro-organismos patogênicos, é uma também uma via de contágio e dada a dificuldade para impedir a entrada desses patógenos nas áreas de processamento de alimentos é necessário tomar medidas rigorosas para a remoção durante o processo de limpeza e desinfecção e conhecer os parâmetros que limitam o seu

desenvolvimento. Um dos problemas enfrentados pela indústria são os produtos químicos usados para desinfetar superfícies, tais como ácido peracético, compostos de amônio quaternário e compostos de cloro, que não garantem a eliminação do patógeno ou perdem a sua eficácia na presença de matéria orgânica, tais como o cloro. Este problema é agravado devido à capacidade da *L. monocytogenes* em formar biofilme em superfícies, tornando-se difícil a ação de desinfecção (LUNDEN, 2004).

Estudos epidemiológicos e microbiológicos têm demonstrado que a contaminação cruzada durante o fatiamento e o crescimento bacteriano na estocagem são responsáveis pela origem da contaminação dos APC e a causa das doenças transmitidas por estes alimentos. Eles são contaminados principalmente durante a manipulação inadequada nos pontos de vendas e particularmente, máquinas de fatiar e utensílios de corte são apontados como os principais veículos da contaminação (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2010).

Para redução da contaminação dos alimentos e das notificações de surtos de origem alimentar, as boas práticas de manipulação surgem como importante ferramenta de prevenção e como conceito genérico, consiste em procedimentos que devem ser adotados por serviços de alimentação a fim de garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos alimentos com a legislação sanitária com o objetivo de produzir alimentos seguros para o consumidor (BRASIL, 2004; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2010).

Deste modo, alguns países têm informado uma redução da frequência da listeriose que se justifica, muito provavelmente, pelos esforços realizados pelas indústrias e órgãos fiscalizadores na efetiva aplicação das Boas Práticas de Higiene (BPH) e a implementação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), a fim de reduzir a ocorrência e o alcance de *L. monocytogenes* nos alimentos prontos para o consumo, como também a melhoria da manutenção da cadeia do frio ao longo da produção, com a finalidade de diminuir temperaturas inadequadas que favorecem a proliferação de *L. monocytogenes* (CODEX, 2009).

Com o objetivo de reduzir a ocorrência de surtos de listeriose, o *United State and Department of Agriculture* (USDA) e o *Food and Drug Administration* (FDA) em 2001, elaboraram o *Listeria Action Plan* (Plano de Ação Listeria) com foco em derivados de carne e aves prontos para o consumo. Corroborando com essa meta, a WHO em 2004 lançou o documento Avaliação de risco de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo. Em consonância, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)

do Brasil publicou em 2009 a Instrução Normativa nº 09 que instituiu os procedimentos de controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para consumo (FAI, 2011; WHO, 2004; BRASIL, 2009).

Diante disto, a qualidade higiênico-sanitária como fator de segurança alimentar tem sido amplamente analisada e discutida, uma vez que as doenças veiculadas por alimentos são um dos principais fatores que contribuem para os índices de morbidade nos países da América Latina e do Caribe. O Comitê WHO/FAO considerou que doenças oriundas de alimentos contaminados seja provavelmente, o maior problema de saúde no mundo contemporâneo e uma das causas seja a contaminação cruzada dos alimentos pela falta de práticas higiênicas implantadas nos estabelecimentos manipuladores de alimentos (SILVA, 1998).

3.6. Métodos de identificação de *Listeria* spp.

Os vários atributos que possui a *Listeria* spp. permite seu crescimento e multiplicação em diversos alimentos e no meio ambiente, mesmo sob condições desfavoráveis. Por esta razão são necessários métodos sensíveis capazes de detectar e rastrear esse patógeno ao longo de toda a cadeia de produção e que atendam a diversas necessidades e requisitos de órgãos fiscalizadores, cientistas e indústrias alimentícias. Entre as exigências, o nível de detecção com base em gênero, espécie ou estirpe são informações relevantes para que se possa integrar a análise de risco e vias de contaminação (ZUNABOVIC et al., 2011).

A princípio, ensaios fenotípicos, bioquímicos e imunológicos, bem como método genotípico são utilizados para uma diferenciação, detecção e identificação de *Listeria* spp. e o tempo de preparação, habilidades e objetividade ao avaliar os resultados diferem entre estes métodos. Métodos moleculares de cultura independente e cultura dependente fortalece o conhecimento sobre a diversidade de ecossistemas microbianos, a interação associadas aos alimentos e influências no processamento de alimentos sobre questões de segurança microbiológica (ZUNABOVIC et al., 2011).

Métodos tradicionais de cultura e identificação envolvem o enriquecimento seletivo e plaqueamento seguido pela caracterização de *Listeria* spp. com base na morfologia da colônia, a fermentação de açúcar e propriedades hemolíticas. Estes métodos são o padrão ouro, também conhecido com métodos tradicionais, mas são demorados e pode não ser adequado para ensaios de alimentos com vida útil curta por exemplo. Com resultados mais

rápidos foram desenvolvida análise baseadas em anticorpos (ELISA) ou técnicas de biologia molecular (PCR ou qPCR). Estes testes possuem sensibilidades e especificidade semelhantes, são rápidos e permitem um resultado no prazo máximo de 48 horas. (HANSBRO, 2005).

Essa obtenção de resultados em um período mais curto de tempo possibilita a realização de ações corretivas durante o processamento do alimento, a retirada de um lote do comércio, bem como a verificação das condições de higiene das áreas de manipulação de alimentos (FRÖDRE, 2005).

3.7. *Listeria* spp. nas áreas de manipulação de alimentos

A presença da *Listeria* spp. em matérias-primas, tais como leite e seus derivados, carne, embutidos cárneos, peixes e vegetais, reforça a necessidade dos estabelecimentos processadores de alimentos estabelecerem barreiras que minimizem a entrada nas áreas de processo dos alimentos, especialmente em locais onde o alimento considerado pronto para o consumo seja manipulado. Portanto, esses estabelecimentos devem ser providos de barreiras sanitárias, controle dos uniformes de pessoal, lavagem das mãos e o controle de visitantes nas suas instalações. (SCHÖBITZ et al., 2009).

Lakicevic et al. (2010) isolaram 16,3% (23/141) de *Listeria* spp. em ambientes de processamento de alimentos em Belgrado, Sérvia.

Blatter et al. (2010) na Suíça, detectaram *L. monocytogenes* em 3,5% (70/2028) de *swabs* procedentes de locais de processamento de alimentos pronto para o consumo. Gianfranceschi et al. (2003) realizaram um levantamento na Itália e identificaram uma contaminação de 6,1% (58/958) de *L. monocytogenes* em ambiente processadores de alimentos. Mas, Parisi et al. (2013) identificaram em ambientes processadores de alimentos 44,9% (19/43) de *L. monocytogenes* também na Itália

Em trabalho realizado na Argentina, foram encontradas 5% de *L. monocytogenes* dos 20 pontos coletados de utensílios e geladeiras de áreas de fatiamento de presuntos. (ALVAREZ et al., 2004).

Silva e colaboradores (2004), no seu estudo em Pelotas, Rio Grande do Sul, verificaram a ocorrência de *L. monocytogenes* na planta de processamento de linguiça mista fresca e isolaram em 100% das 41 amostras analisadas nos três estabelecimentos estudados.

Além disso, observou que há disseminação do patógeno durante o processamento, promovendo assim a contaminação recorrente no produto final.

Em pesquisa realizada por Silva et al. (2003) das 228 amostras coletadas, 17% foram positivas para *Listeria* spp. provenientes do ambiente de manipulação de alimentos. As cepas isoladas foram a 4b e 1/2a, onde ambas são frequentemente envolvidas em surtos de listeriose.

Barros et al. (2004), em sua pesquisa determinaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em diversos pontos de plantas de processamento de carne bovina em um abatedouro e cinco casas de carnes no Paraná. Os resultados indicaram frequências de 6,25% de *L. monocytogenes*; 68,75% de *L. innocua*; 18,75% de *L. welshimeri*; 4,17% de *L. seeligeri* e 2,08% de *L. grayi*, provenientes de equipamentos de casa de carnes como caixas plásticas e amaciador.

Cesar e colaboradores (2011) em estudo colheram 16 pools de *swabs* ambientais de uma em salsicharia em Goiás nos quais 37,5% foram positivas para *Listeria* spp.. Destas, 50% foram positivas para *L. monocytogenes*.

Cruz et al. (2008) identificaram que das 63 amostras coletadas de superfície de contato com os alimentos, 44% eram positivas para *Listeria* spp. e 32% para *L. monocytogenes*. Para as superfícies que não entravam em contato com os alimentos, das 44 amostras coletadas, 55% e 43% foram positivas para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, respectivamente.

No geral, o controle da *Listeria* spp. no ambiente de manipulação de alimentos é dificultado pelo fato da bactéria ter sua origem no ambiente. Desta forma, há necessidade da análise frequente para a detecção da *L. monocytogenes* em produtos e amostras ambientais objetivando o controle efetivo deste patógeno nos estabelecimentos manipuladores de alimentos (BARANCELLI et al., 2011).

Em estudo realizado por Bersort e colaboradores (2008) foi avaliada a multiplicação de *L. monocytogenes* naturalmente presente em mortadelas fatiadas, embaladas a vácuo e estocadas a 5°C durante sua vida de prateleira, que indicou a multiplicação durante o armazenamento. Com isso, a estocagem sob refrigeração não foi suficiente para o controle da multiplicação de *L. monocytogenes* em mortadelas fatiadas, reforçando que boas práticas de fabricação e um sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) implantado são importantes para garantir a segurança dos alimentos.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, E. E; MARZOCCA, M. A.; MARUCCI, M. G.; SICA, M. G. Detección de *Listeria monocytogenes* em distintos productos alimentícios y em muestras ambientales de uma amplia cadena de supermercados de La ciudad de Bahia Blanca (Argentina). **Revista Argentina de Microbiología**, v. 36, p. 179-181, 2004.

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B Higienização na Indústria de Alimentos. 1. ed. São Paulo: Varela, 1996. 182p.

BARANCELLI, G. V. SILVA-CRUZ, J.V. PORTO E. OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: Ocorrência em produtos lácteos e suas aplicações em saúde pública. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.

BARBUDDHE, S. B. MALIK, S. V. S. ASHOK KUMAR, J. KALOREY, D. R. CHAKRABORTY, T. Epidemiology and risk management of listeriosis in India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 113-118, 2012.

BARROS, M. A. F. BELOTI, V. HAGA, M. M. CAVALETTI, L. D'OVÍDIO, L. MONTEIRO, F. A. NERO, L. A. *Listeria* spp. ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 341-348, 2004.

BERSOT, L. S. GILLIO, C. TAVOLARO, P. LANDGRAF, M. FRANCO, B. D. G. M. DESTRO, M. T. Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 39, p. 514-516, 2008.

BRASIL, ANVISA, 2001. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**.

BRASIL, ANVISA, 2004. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Aprova o **Regulamento Técnico sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação**.

BRASIL. Instrução Normativa nº 09, de 08 de abril de 2009. Aprova os **Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em Produtos de Origem Animal Prontos para o Consumo**.

BRASIL, Ministério da Saúde, Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2010.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology** v.145, p. 1-8, 2011.

CDC, Centers for Diseases Control and Prevention, 2012 Disponível em: [<http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html>].

Regulamento (CE) Nº 2073/05 de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. Jornal Oficial da União Européia.

Regulamento (CE) Nº 1441/07 de 05 de dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) Nº 2073/05, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. Jornal Oficial da União Européia.

CESAR, A. P. R.; MESQUITA, A. J. M.; PRADO, C. S.; NUNES, I. A.; FILHO E. S. A., *Listeria* spp. E *Listeria monocytogenes* na produção de salsichas tipo hot dog. **Ciência Animal Brasileira**, v.1 2, n.2, p. 339-352, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS **Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in food** – CAC/GL 61 – 2009.

CRUZ, C. D.; FLETCHER, G. C. Prevalence and biofil-forming ability of *Listeria monocytogenes* in New Zealand mussel (*Perna canaliculus*) processing plants. **Food Microbiology** v.28, p. 1387-1393, 2011.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 2, p. 195-206, 2008.

CRUZ, C.D. SILVESTRE, F.A. KINOSHITA, E.M. LANDGRAF, M. FRANCO, B.D.G.M. DESTRO, M.T. Epidemiological survey of *listeria monocytogenes* in a Gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal Microbiology**, vol.39, n.2, p. 375-383. 2008.

D'OVÍDIO, L. (2011) Listeriose. In: Manual de Zoonoses. Volume II – 1º edição, 2011.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbial Reviews**, v.55, n.3, p. 476-511, 1991.

FAI, A. E. C.; FIGUEREDO, E. A. T.; VERDIN, S. E. F.; PINHEIRO, N. M. S.; BRAGA, A. R. C.; STAMFORD, T. L. M. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza/CE: fator de risco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 2, p. 657-662, 2011.

FLORES, T. G.; HERRERA, R. A. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. **Salud publica de México**, v. 47, n. 5, p. 388-390, 2005.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.424p

FRANCO, B. D. G. H.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002. 182p

FREITAS, L. H. **Sistema especialista para diagnóstico de toxinfecções alimentares de origem bacteriana**. 1995. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

FRÖDER, H. **Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas.** 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S., **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 2ed. São Paulo: Varela, 2003, 655p.

GUILLET, C. JOIN-LAMBERT, O. LE MONNIER, A. LECLERCQ, A. MECHAI, F. BRUNEEL, M.F.M. BIELECKA, M. K. SCORTTI, M. DISSON, O. BERCHE, P. VAZQUEZ-BOLAND, J. LORTHOLARY, O. LECUIT, M. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 136-138, 2010.

HANSBRO, P. M.; GASANOV, U.; HUGHES, D.; Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 851-875, 2005.

HEALT CANADA. Health products and food branch. Food director. **Policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods.** 2011.

HOFER, E. REIS, C. M. F. HOFER, C. B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39(1):32-37, jan-fev, 2006

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

JEONG, D. K.; FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10oC in biofilms with microorganisms isolated from milk and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, v.57, p.576-586, 1994.

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

LAPENDA, A. M. V. S. **Ocorrência de *Listeria spp* em embutidos resfriados comercializados na cidade do Recife, PE.** Recife: UFRPE, 74 f.: Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010.

LIU, D. Epidemiology. In Liu, D., **Handbook of *Listeria monocytogenes*.** New York: CRC Press. 2008, 554p.

LUNDEN, J.M.. Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants. **Department of Food and Environmental Hygiene,** Helsinki: Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland, 2004, 60 p.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS E. B.; GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA,** v. 4, n. 1, p. 180-192. 2007.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS E. B.; GOUVÊA. 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, 2007.

MARTINS, E. A., ***Listeria monocytogenes* em produtos fatiados do tipo ready-to-eat, presunto cozido e salame, comercializados no município de São Paulo: Ocorrência, quantificação e sorotipagem.** São Paulo: USP, 2008, 76f. Tese (Doutorado na Faculdade de Saúde Pública). Universidade de São Paulo, 2009.

MARTINS, E. A.; GERMANO, P. M. L. *Listeria monocytogenes* in read-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo: Occurrence, quantification and serotyping. **Food Control,** v. 22, p. 297-302, 2011.

MEAD, P.S. SLUTSKER, L., DIETZ, V. MCCAIG, L. F. BRESEE, J. S. SHAPIRO, C. GRIFFIN, P. M. TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Disease** v. 5, n. 5, p. 607-625, 1999.

PERES, N. D. **Detecção de *Listeria monocytogenes* em leite: sensibilidade e especificidade da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 2007. 43 p. Dissertação (Mestrado – Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. CASTRO, R. POSADA-IZQUIERDO, G. D. VALERO, A., CARRASCO, E. GARCÍA-GIMENO, R. M. ZURERA, G. Evolution of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. **Meat Science**, v. 86, p. 479-485, 2010.

PIRES, A. C. S.; ARAÚJO, E. A.; CAMILLOTO, G. P.; RIBEIRO, M. C. T.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J. Condições higiênicas de fatiadores de frios avaliadas por ATP bioluminescência e contagem microbiana: Sugestão de higienização conforme RDC 275 da ANVISA. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n.2, p. 123-129, 2005.

PITA, J. S. M. **Surto de listeriose entre 2009 e 2011 em Lisboa e Vale do Tejo - investigação e medidas implementadas pela ASAE**. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária 2012. p. 107. Dissertação (Mestrado – Medicina Veterinária) Universidade Técnica de Lisboa, 2012.

RATTI, R. P. **Listeria em alimentos fatiados e equipamentos: ocorrência, formação de biofilme e controle**. Ribeirão Preto – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto 2006. 96 p. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas a Farmácia) Universidade de São Paulo, 2006.

SCHÖBITZ, R.; CIAMPI, L; NAHUELQUIN, Y., *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. **Agro Sur**. v. 37, n. 1, p. 1-8, 2009.

SILVA, I. M. M. ALMEIDA, R.C.C. ALVES, M.A.O. ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 241-248, 2003.

SILVA, M.C.D.; VILARDI, T.C.C.; TIBANA, A.. Avaliação de métodos para a detecção de listeria em queijos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 18, n. 2, p.150-155, 1998.

SILVA, W. P. NALÉRIO, E. S. ARAÚJO, M. R. MENDONÇA, K. S. BASSANI, M. T. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 626-630, 2009.

SILVA, W. P. LIMA, A. S. GANDRA, E. A. ARAUJO, M. R. MACEDO, M. R. P. DUVAL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, BRASIL. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 911-916, 2004.

TOYOSHIMA, M. T. K. APANAVICIUS, A., SOEIRO A. M. ALMEIDA, G. M. D. ARAI M. H. *Listeria monocytogenes* PERITONITIS IN CIRRHOTIC PATIENTS:FIRST DESCRIPTION IN BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, n. 5, p. 291-293, 2006.

WAGNER, M. MCLAUCHLIN, J. Biology. In Liu, D., **Handbook of *Listeria monocytogenes***. New York: CRC Press. 2008, 554p.

World Health Organization and Food and Agriculture Organization. WHO and FAO. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. MRA series N° 4-5. Publishing Management Service, Rome, Italy, 2004.

ZUNABOVIC, M. DOMIG, K. J. KNEIFEL, W. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review. **LWT – Food Science and Technology**, n. 44, p. 351-262, 2011.

5 ARTIGO

Ocorrência de *Listeria* spp. em áreas de processamento de estabelecimentos varejista de alimentos no Estado de Pernambuco, Brasil.

(Artigo enviado para Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos)

Ocorrência de *Listeria* spp. em áreas de processamento de estabelecimentos varejista de alimentos no Estado de Pernambuco, Brasil.

Occurrence of *Listeria* spp. in processing areas of retail food stores in the Brazilian state of Pernambuco.

SIQUEIRA, M. G. F. M.¹, MOTA, R. A.¹, SILVA, J. C. R.¹, PINHEIRO JÚNIOR, J. W.¹,
KIM, P. C. P.¹, LINS, L. F.¹ MOURA, A. P. B. L.^{1*}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

*Autor para Correspondência: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Av. Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil. Email: andrea@dmv.ufrpe.br

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo isolar e identificar *Listeria* spp. em áreas de processamento de estabelecimentos varejistas de alimentos no Estado de Pernambuco, Brasil. Para este estudo foram colhidas 86 amostras de *swabs* procedentes de equipamentos, utensílios e instalações utilizados para processamento de embutidos, distribuídas em dez estabelecimentos varejistas. Para identificação de *Listeria* spp. utilizou-se o método rápido 3MTM, Quick Swab e 3MTM PetrifilmTM. A identificação de *Listeria monocytogenes* foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Nos estabelecimentos foi realizada uma lista de verificação para avaliar as condições higiênico-sanitárias dos pontos de coletas. Das 86 amostras analisadas, 27 (31,2%) [I.C. 21,81- 42,30%] foram positivas para *Listeria* spp. e destas, uma (3,7%) para *Listeria monocytogenes*. Os pontos de maior contaminação foram o piso (50,0%), placa de polietileno (42,9%) e faca (40,0%). Dos dez estabelecimentos analisados observou-se que oito (80,0%) tiveram ao menos uma amostra positiva para *Listeria* spp. Ao analisar a associação entre as condições higiênico-sanitárias dos pontos de coletas e exame microbiológico, foi constatado não haver diferença significativa ($p = 0,700$). Diante dos resultados obtidos conclui-se que a *Listeria* spp. está amplamente distribuída nos ambientes estudados o que pode favorecer a contaminação dos alimentos e conseqüentemente oferecer riscos à saúde pública. Desta forma, recomenda-se que parâmetros microbiológicos devem ser estabelecidos pelos órgãos reguladores de saúde para alimentos cárneos e seus embutidos com o intuito de oferecer um alimento seguro para os consumidores.

Palavras-chave: boas práticas de fabricação, *Listeria monocytogenes*, saúde pública, supermercados

ABSTRACT

The aimed of this study was to isolate and identify *Listeria* spp. in processing areas of retail food stores in the state of Pernambuco, Brazil. For this study we collected 86 swabs samples from equipment, fixtures and facilities used for meat products processing, distributed in ten retail food stores. For the identification of *Listeria* spp. was used the 3M™ quick method, Quick Swab and 3M™ Petrifilm. The identification of *Listeria monocytogenes* was performed by the technique of Polymerase Chain Reaction in Real Time (qPCR). In the stores was made a checklist to assess the hygienic-sanitation conditions of the collection points. Of the 86 samples analyzed, 27 (31.2%) [I.C. 21.81 to 42.30%] were positive for *Listeria* spp. and of these, one (3.7%) for *Listeria monocytogenes*. The major points of contamination were the floor (50.0%), polyethylene plate (42.9%) and knife (40.0%). It was observed that of the ten stores analyzed, eight (80%) had at least one positive sample for *Listeria* spp. When analyzing the association between the hygienic-sanitation conditions of the collection points and microbiological analysis, we found no significant difference ($p = 0.700$). Based on these results it is concluded that the *Listeria* spp. is widely distributed in the areas that was studied, which may favor the food contamination and therefore present a risk for public health. Thus, it is recommended that microbiological parameters should be set by health regulatory agencies for meat and its meat products in order to provide a safe food for consumers.

Keywords: good manufacturing practices, *Listeria monocytogenes*, public health, supermarket

INTRODUÇÃO

A *Listeria* spp. é uma bactéria Gram-positiva, bastonete curto, não formador de esporos, anaeróbias facultativas, possui caráter ubiqüitário. Atualmente há oito espécies reconhecidas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii* e *L. rocourtiae*. Destas, a *L. monocytogenes* é um patógeno oportunista para humanos e *L. ivanovii* para outros mamíferos. Porém, já houve casos da *L. seeligeri* e *L.*

ivanovii como causa de doenças em humanos (HANSBRO, 2005; GUILLET, 2010; BARBUDDHE, 2012).

L.monocytogenes é um micro-organismo que exige atenção em locais de processamento de alimentos, devido a algumas particularidades que propiciam sua ocorrência, dentre as quais, destaca-se a distribuição e sobrevivência no meio ambiente, mesmo em condições adversas. Esta espécie requer um mínimo de nutrientes, e possui capacidade de se multiplicar sob temperaturas de refrigeração, tolerância a altas concentrações de sal e pH relativamente baixo (MARTINS, 2009).

Estudos realizados no Brasil identificaram a presença de *Listeria* spp em indústrias e casa de processamento de carne bovina. Barros et al. (2004), no Estado do Paraná, isolaram em equipamentos, instalações e utensílios, *L. monocytogenes* (6,25%); *L. innocua* (68,75%); de *L. welshimeri* (18,75%); de *L. seeligeri* (4,17%) e de *L. grayi* (2,08%). No estado de Goiás, estudo conduzido por Cesar e colaboradores (2011) identificou em 37,5% (6/16) de *swabs* do ambiente, a presença de *Listeria* spp. das quais 50,0% (3/6) foram confirmadas como *Listeria monocytogenes*.

Estudos epidemiológicos e microbiológicos têm demonstrado que a contaminação cruzada durante o fatiamento e o crescimento bacteriano durante a estocagem são um dos principais responsáveis na contaminação dos alimentos prontos para consumo (APC) e como consequência causa das doenças transmitidas por esses alimentos (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2010). Com isso também tem aumentado a preocupação por parte das indústrias e dos órgãos fiscalizadores para o controle da *Listeria* spp. (GERAMANO E GERMANO, 2003).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº12, de 2 de janeiro de 2001, estipula os padrões microbiológicos para *L. monocytogenes* em queijos, não sendo contemplado a pesquisa de *Listeria* spp. em outros produtos de origem animal e instalações das indústrias de alimentos.

De acordo com a literatura consultada, na região nordeste do Brasil, não há estudos relacionados a pesquisa de *Listeria* spp. em indústrias e comércio varejista de alimentos. Neste sentido a pesquisa deste micro-organismo se faz necessária em áreas de processamento de alimentos de origem animal, para subsidiar os órgãos de vigilância em saúde na garantia de oferecer um alimento seguro para os consumidores. Desta forma, objetivou-se com este estudo pesquisar *Listeria* spp. em áreas de processamento de um estabelecimento varejista de alimentos no estado de Pernambuco, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

A pesquisa foi realizada em dez estabelecimentos varejistas de alimentos nas cidades de Caruaru, Jaboatão dos Guararapes e Recife do estado de Pernambuco, sendo analisados 86 pontos procedentes de áreas de manipulação de embutidos. A amostragem foi não probabilística por conveniência.

Os pontos de amostragem foram: balança, placa de polietileno, faca, mesa de manipulação, fatiador, balcão refrigerado, parede, piso e ralo, sendo uma amostra de cada por loja.

Nas coletas foi utilizada a técnica de esfregação de superfícies com Quick Swabs 3MTM de acordo com o preconizado pelo fabricante e com moldes estilizados de aço inox de 10cm² conforme a metodologia de Lakicevic et al. (2010). A utilização de cada um dos moldes foi determinada de acordo com a dimensão do ponto amostrado, e quando o formato não permitia a adequação dos mesmos, toda a superfície foi amostrada, neste caso a faca e o ralo foram os pontos onde toda a superfície foi amostrada.

As amostras dos Quick Swabs 3MTM foram mantidas sob-refrigeração e encaminhadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável para o laboratório para posterior análise.

Análise microbiológica para *Listeria* spp.

As amostras foram processadas em placas 3M PetrifilmTM contendo meio específico para isolamento de *Listeria* spp. Após o processamento as mesmas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C ± 1°C por 28-30 horas. Após esse período as colônias suspeitas foram armazenadas em tubos do tipo de *ependorff* com solução Tampão fosfato-salino (PBS) para posterior identificação.

Identificação molecular de *Listeria monocytogenes*

Para a extração de DNA foi utilizado kit comercial Mericon DNA Bacteria Plus Kit (Qiagen®, Hilden, Germany), de acordo com o protocolo do fornecedor para bactérias gram positivas. Foram utilizados como pares iniciadores o LL5 (5'-AACCTATCCAGGTGCTC-3') e LL6 (5'-CTGTAAGCCATTTTCGTC-3'), descritos nos estudos de Barocci et al. (2008), desenhados a partir do gene listeriolysina O (*hlyA*), da *L. monocytogenes* patogênica, amplificando uma sequência de 267 pares de base (pb).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µl contendo: 12,5µl do QuantiFast™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen®, Hilden, Germany); 1,0µl de cada primer (LL4 e LL5) à 30pMol; 5µl de DNA genômico, numa concentração média de 7ng/mL; e 5,0µl de água ultrapura Nuclease-Free (Amresco®, Ohio, EUA). O perfil térmico das etapas de reações foi realizado em um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen®, Hilden, Germany), consistindo de uma desnaturação do DNA inicial a 95°C por 5 minutos, e seguida de 35 ciclos a 95°C por 10 minutos para a desnaturação, 60°C por 30 segundos para o anelamento e extensão, seguindo protocolo descrito pelo fornecedor para QuantiFast™ SYBR® Green PCR Kit.

Como controle positivo da reação, foi utilizado DNA de amostras positivas para *L. monocytogenes* confirmadas através de isolamento microbiológico e testes bioquímicos para confirmação das características fenotípicas; e como controle negativo da reação, foi utilizada água ultrapura Nuclease-Free (Amresco®, Ohio, EUA).

O resultado foi captado por fluorescência e analisado através de software Rotor-Gene Q Series Software versão 1.7.

Avaliação das condições higiênico-sanitárias

Uma lista de verificação foi aplicada durante as coletas para avaliação dos níveis de higienização dos equipamentos e de cada estabelecimento estudado, com foco na área de manipulação de embutidos (BRASIL, 2004; PÉREZ-RODRIGUEZ, 2010). (Apendice 1)

Análise estatística

Os resultados microbiológicos foram analisados por estatística descritiva através da obtenção da distribuição absoluta e relativa. Para análise de associação entre as condições higiênico-sanitárias dos pontos de coletas e exame microbiológico foi utilizado o teste de qui-quadrado com auxílio do programa computacional EPI INFO versão 3.5.1.

RESULTADOS

Do total de 86 amostras analisadas 27 (31,39%) foram positivas para *Listeria* spp. no isolamento microbiológico e destas uma (3,70%) foi classificada como *Listeria monocytogenes* pelo qPCR (Figura 1). Em relação aos estabelecimentos analisados, constatou-se a ocorrência de isolamento de *Listeria* spp em 80,0%.

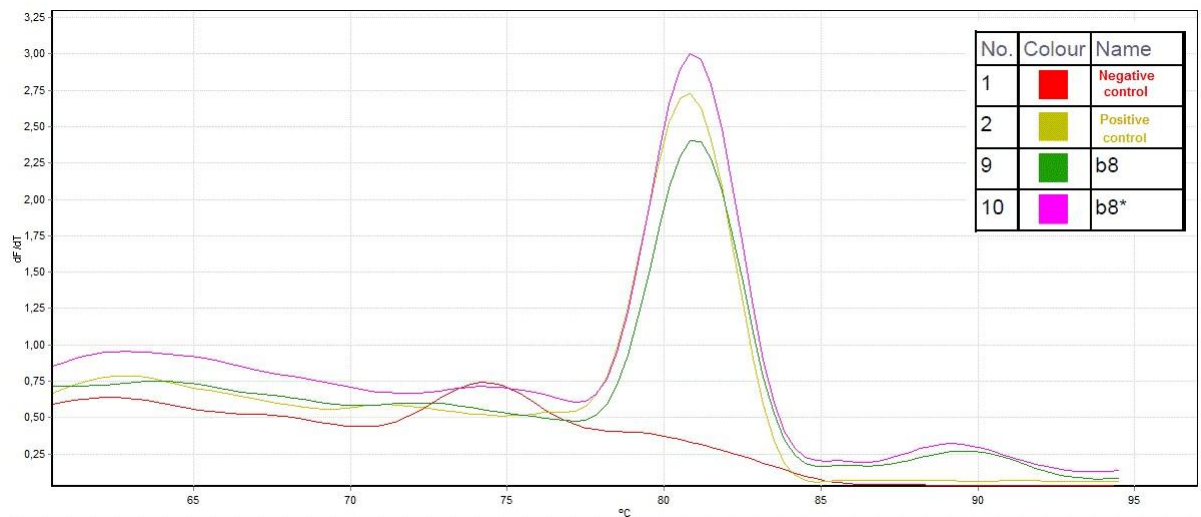


Figura 1 – Resultado do qPCR para classificação de *L. monocytogenes* nas amostras positivas para *Listeria* spp.

Os resultados, por ponto de coleta, obtidos na análise microbiológica encontram-se dispostos na Tabela 1. Observou-se o isolamento de *Listeria* spp. em todos os pontos coletados (100,0%), onde uma maior frequência foi identificada no piso (50,0%), ralo (42,9%), placa de polietileno (40,0%) e faca (40,0%).

Tabela 1 – Pesquisa de *Listeria* spp. em diferentes ponto amostrais de áreas de manipulação de embutidos de estabelecimento varejista em Pernambuco, Brasil.

Pontos de amostragem	N	<i>Listeria</i> spp.		
		F.A.	F.R. (%)	IC. (95,0%)
Balança	10	3	30	[6,67-65,24]
Placa	10	4	40	[12,15-73,76]
Faca	10	4	40	[12,15-73,76]
Mesa	10	3	30	[69,15-100]
Fatiador	9	1	11,11	[0,28-48,25]
Balcão refri.	10	3	30	[6,67-65,24]
Parede	10	1	10	[0,25-44,50]
Piso	10	5	50	[18,70-81,29]
Ralo	7	3	42,9	[9,90-81,59]

Legenda – N: Número da amostra; F.A. Frequência absoluta; F.R. Frequência relativa; IC: intervalo de confiança.

Ao analisar a associação entre as condições higiênico-sanitárias dos pontos de coletas e exame microbiológico, foi constatado não haver diferença significativa (Tabela 3).

Tabela 2 – Associação entre as condições higiênico-sanitárias e exame microbiológico de áreas de manipulação de embutidos de estabelecimento varejista em Pernambuco, Brasil.

Classificação	Positivo		Negativo		Total		Valor de p
	F.A.	F.R (%)	F.A.	F.R (%)	F.A.	F.R (%)	
Inadequada	21	30,4	48	69,6	69	80,23	0,700
Aceitável	6	35,4	11	64,6	17	19,77	

Legenda – F.A. Frequência relativa; F.R. Frequência relativa;

DISCUSSÃO

Este é o primeiro registro da ocorrência de *Listeria* spp. em áreas de manipulação de alimentos de estabelecimentos varejista no estado de Pernambuco, Brasil. Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os encontrados no Brasil por Barros et al. (2004), Silva et al. (2010) e Cesar et al. (2011). Resultados diferentes foram relatados por Lakicevic et al. (2010) que isolaram 16,3% (23/141) de *Listeria* spp. em ambientes de processamento de alimentos em Belgrado, Sérvia. A diferença entre os resultados pode está relacionada com os locais de onde foram obtidas as amostras avaliadas e métodos de diagnóstico utilizados.

A ocorrência elevada de isolamento de *Listeria* spp. nos pontos de coleta nos estabelecimentos estudados é preocupante, pois pode ocorrer contaminação cruzada nos alimentos e causar surtos de listeriose. De acordo com CDC (2011) no período de 1998-2008, em média 2,4 surtos por ano foram notificados nos Estados Unidos. Nesse período o maior surto ocorreu em 2002, quando houve notificação de 54 casos, com oito mortes e três mortes fetais e foram associados com o consumo de presunto de peru.

A transmissão da *Listeria* spp. para o homem pode ocorrer principalmente através de alimentos como derivados lácteos, leite cru ou pasteurizado, sorvete e queijos, bem como produtos cárneos crus ou processados de várias origens (bovinos, caprinos, ovinos, aves), peixes, embutidos e os alimentos prontos para consumo (GERMANO e GERMANO, 2003; D’OVIDIO, 2011).

Os alimentos manipulados nas áreas estudadas não recebiam nenhum tratamento térmico antes de sua comercialização, aumentando o risco de contaminação dos

consumidores, especialmente aqueles pertencentes aos grupos de riscos para listeriose como gestantes, crianças, idosos e imunodeprimidos.

Em relação à identificação das espécies de *Listeria* spp, observou-se que apenas 3,7% (1/27) foi identificada como *Listeria monocytogenes*. Esta amostra foi isolada na placa de polietileno. Corroborando com esse resultado, Blatter et al. (2010) na Suíça, detectaram *L. monocytogenes* em 3,5% (70/2028) de *swabs* procedentes de locais de processamento de alimentos pronto para o consumo. Gianfranceschi et al. (2003) realizaram um levantamento na Itália e identificaram uma contaminação de 6,1% (58/958) de *L. monocytogenes* em ambiente processadores de alimentos. Mas, Parisi et al. (2013) identificaram em ambientes processadores de alimentos 44,9% (19/43) de *L. monocytogenes* também na Itália. No Brasil, Cesar et al. (2011) identificaram em seis pools de *swabs* ambientais, 50% de *L. monocytogenes* de indústria de salsichas tipo hot dog no estado de Goiás. Barros et al. (2004) indicaram a frequência de 6,25% de *L. monocytogenes* provenientes de equipamentos e utensílios de casas de carne do estado do Paraná.

A baixa frequência de *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas pode estar relacionada com a competição desse micro-organismo com os diferentes patógenos presentes no ambiente, assim como com as diversas espécies de *Listeria* spp. Segundo Mottin (2008) o crescimento de *L. monocytogenes* pode ser inibido por fatores como estresse, número inicial da bactéria no ambiente e a inibição do crescimento frente a outros micro-organismos presentes no ambiente.

É importante salientar que o uso da técnica de qPCR mostrou-se rápida, eficaz, fácil manipulação, confiável e altamente específicos, corroborando com os estudos de Barocci et al. (2008) e Lakicevic et al. (2010).

Dos dez estabelecimentos analisados, observou-se o isolamento de *Listeria* spp. em 80,0% deles, o que demonstra que essa bactéria está amplamente distribuída nos estabelecimentos varejistas de alimentos estudadas e que medidas de controle devem ser implementadas.

O piso foi o ponto de coleta com maior frequência (50,0%) para o isolamento de *Listeria* spp. Esse número poderia ter sido maior devido às condições higiênico-sanitárias precárias encontradas durante a coleta, visto que em todas as lojas os pisos estavam em situações inadequadas de limpeza, o que pode justificar também uma baixa frequência de isolamento de *L. monocytogenes*.

A frequência de isolamento para *Listeria* spp. foi de 42,8% (3/7). Apesar do sistema de drenagem e piso não serem considerados fontes de contaminação para os alimentos, serve de indicativo de que há contaminação por *Listeria* spp. na área de processamento analisada.

A placa de polietileno foi um dos utensílios de maior ocorrência com 40,0% de positividade para *Listeria* spp. e onde foi identificada a única *Listeria monocytogenes*. Este utensílio é utilizado para a abertura de embalagens e corte das peças de produtos e por ser de material plástico, ao corte, acontecem ranhaduras permitindo o acúmulo de material orgânico, que dificulta a higienização adequada, possibilitando a formação de biofilme. Breindt et al. (2006) descrevem que a formação do biofilme é influenciada por vários fatores como características das amostras, propriedades físico-químicas dos substratos de fixação da bactéria, além da fase de crescimento, temperatura e presença de outros micro-organismos.

Nos fatiadores apesar da frequência de *Listeria* spp ter sido baixa (11,11%), o processo de fatiar nos alimentos prontos para consumo é considerado um risco de contaminação, pois resíduos presentes nesses equipamentos podem resultar em locais de crescimento do patógeno, formação de biofilme e a contaminação do produto durante a operação.

Em seus estudos Ratti (2006) isolou *L. monocytogenes* em equipamento de fatiar e presunto fatiado em mesmo estabelecimento comercial, o que indica que existe o risco da contaminação cruzada através do processo de fatiamento. Ainda segundo Ratti, no Brasil são poucos os relatos sobre a ocorrência de *Listeria* spp. em ambientes e equipamentos de supermercados e devido as suas condições de manipulação e armazenamento, os alimentos prontos para consumo são veiculadores de patógenos em potencial.

Cesar et al. (2011) afirmam que partes de equipamentos, onde são difíceis de higienizar, como esteiras, picadoras, fatiadoras e embaladoras são um dos principais locais de identificação de *L. monocytogenes*, mesmo após as operações de limpeza.

Outro ponto a ser considerado é que o processo de higienização não conforme com as exigências da RDC nº 216 da ANVISA (BRASIL, 2004) instituído nos estabelecimentos estudados proporciona a contaminação do ambiente e ao risco de veicular a *Listeria* spp. aos alimentos processados e comercializados.

Mottin (2008) afirma que a presença de *Listeria* spp. está relacionada as condições higiênico-sanitária do local de processamento dos alimentos, sendo capaz de permanecer no ambiente, sobrevivendo e multiplicando-se em condições adversas. Desta forma, é possível

que o processo de higienização utilizado pelos estabelecimentos estudados favoreça a contaminação do ambiente, onde não foram visualizados os cronogramas de higienização das áreas, não há o controle das pessoas que circulam e o fatiamento acontece no meio da loja sem a limpeza e climatização adequadas.

Todavia, conforme Lakicevic et al. (2010), a detecção de *Listeria* spp. pode ser considerada como indicativo de que a higiene ou processo de higienização estão inadequados nas áreas de produção de alimentos. Para efeitos de proteção da saúde pública, é importante a identificação de *Listeria* spp., uma vez que estas aumentam a probabilidade da presença de *L. monocytogenes* e permite a tomada de ações preventivas.

Segundo Barancelli et al. (2011) o controle deste patógeno no ambiente de manipulação de alimentos é dificultado pelo fato da bactéria ter sua origem no ambiente. Desta forma, há necessidade da análise frequente para a detecção da *L. monocytogenes* em produtos e amostras ambientais objetivando o controle efetivo deste patógeno nos estabelecimentos manipuladores de alimentos.

Em nenhuma loja foi visualizado o uso correto das luvas. Segundo o *Codex* (2007) as práticas de higiene dos colaboradores são importantes para a prevenção da contaminação por *Listeria monocytogenes* e se deve proporcionar uma devida capacitação e supervisão para assegurar o cumprimento dessas práticas.

A maioria das lojas não possuía uma pia exclusiva para higienização das mãos e em apenas uma loja havia o procedimento de lavagem de mãos fixado em local adequado. Outro ponto é que em nenhuma delas fazia-se uso de utensílio para pegar o produto e proceder sua embalagem para venda. Segundo Hoelzer et al. (2012) as mãos e luvas representam um importante veículo de contaminação cruzada e a implantação de melhores práticas higiênicas como maior frequência da lavagem das mãos, a utilização das luvas de forma adequada faz-se necessária para diminuir a ocorrência de *Listeria* spp. nos alimentos.

Apesar de não ter sido identificada uma associação entre a qualidade de higiene e o exame microbiológico, recomenda-se que medidas de higiene devem ser implementadas nos locais, pois de acordo com Pérez-Rodríguez et al, (2010) em locais que apresentam uma higiene insatisfatória a frequência de isolamento de micro-organismos é mais elevada.

A presença de *Listeria* spp. nas instalações sustenta a necessidade da existência e manutenção de programas de acompanhamento da presença desse patógeno por meio do

monitoramento ambiental com frequência estabelecidas, principalmente em superfícies que entram em contato direto com os alimentos pronto para consumo como é o caso de embutidos evitando a contaminação (CESAR et al., 2011)

Por fim, para redução da contaminação dos alimentos e consequente diminuição das notificações de surtos de origem alimentar, as boas práticas de manipulação são importantes ferramentas de prevenção a fim de garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos alimentos com a legislação vigente (BRASIL, 2004; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2010).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a *Listeria* spp encontra-se amplamente distribuídas nas áreas estudadas, constituindo um fator de risco para a saúde pública.

Medidas de controle higiênico-sanitário são necessárias para minimizar fatores que contribuam com a presença da *Listeria* em estabelecimentos varejistas de alimentos, bem como a implementação e intensificação de ações de inspeção e fiscalização da vigilância sanitária na comercialização dos embutidos nesses estabelecimentos.

Desta forma, recomenda-se que parâmetros microbiológicos devem ser estabelecidos pelos órgãos reguladores de saúde para alimentos cárneos e seus embutidos com o intuito de oferecer um alimento seguro para os consumidores.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

A 3MTM e a Quiagen[®] pela o apoio a pesquisa através da doação de material para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA C. A. F.; *Listeria monocytogenes*: Ocorrência em produtos lácteos e suas aplicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.

BARBUDDHE, S. B. MALIK, S. V. S. ASHOK KUMAR, J. KALOREY, D. R. CHAKRABORTY, T. Epidemiology and risk management of listeriosis in India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 113-118, 2012.

BAROCCI, S., CALZA, L. BLASI, G. BRISCOLINI, S. CURTIS, M. PALOMBO, B. CUCCO, L. POSTACCHINI, M. SABBATINI, M. GRAZIOSI, T. NARDI, S. PEZZOTTI, G. Evaluation of a rapid molecular method for detection of *Listeria monocytogenes* directly from enrichment broth media. **Food Control**, v. 19, p. 750-756, 2008.

BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; HAGA, M. M.; CAVALETTI, L.; D'OVÍDIO, L.; MONTEIRO, F. A.; NERO, L. A. *Listeria* spp. ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 341-348, 2004.

BLATTER, S. GIEZENDANNER, N. STEPHAN, R. ZWEIFEL, C. Phenotypic and molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolated from the processing environment and products of a sandwich-producing plant. **Food Control**, v. 21, p. 1519-1523, 2010.

BRASIL, ANVISA, 2001. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**.

BRASIL, ANVISA, 2004. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Aprova o **Regulamento Técnico sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação**.

BREIDT, J. PAN, Y. KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Applied Environment Microbiology** v. 72, n. 12, p. 7711-7717, 2006.

CDC, Centers for Diseases Control and Prevention, 2012 Disponível em:[<http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html>].

CESAR, A. P. R.; MESQUITA, A. J. M.; PRADO, C. S.; NUNES, I. A.; FILHO E. S. A., *Listeria* spp. E *Listeria monocytogenes* na produção de salsichas tipo hot dog. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.2, p. 339-352, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS **Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in food** – CAC/GL 61 – 2009.

D'OVÍDIO, L. (2011) Listeriose. In: **Manual de Zoonoses**. Volume II – 1º edição, 2011.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S., **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2ed. São Paulo: Varela, 2003, 655p.

GIANFRANCESCHI, M. GATTUSO, A. TARTARO, S. AURELI, P. Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990 and 1999: Serotype distribution in food, environmental and clinical samples. **European Journal of Epidemiology**, v. 18, p. 1001-1006, 2003.

GUILLET, C. et al. Human Listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 136-138, 2010.

HANSBRO, P. M.; GASANOV, U.; HUGHES, D.; Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, p. 851-875, 2005.

HOELZER, K. OLIVER, H. F. KOHL, L. R. HOLLINGSWORTH, J. WELLS M. T. WIEDMANN, M. Structured Expert Elicitation About *Listeria monocytogenes* Cross-Contamination in the Environment of Retail Deli Operations in the United States. **Risk Analysis**, v. 32, n. 7, p. 1139-1156, 2012.

JAY, J. M. Microbiologia dos alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p

LAKICEVIC, B. STJEPANOVIC, A. MILIJASEVIC, M. TERZIC-VIDOJEVIC, A. GOLIC, N. TOPISIROVIC, L. The presence of *Listeria monocytogenes* in a chosen food processing establishment in Serbia. **Archives Biological Sciences**, v. 62, n.4, p. 881-887, 2010.

LUBER, P. CRERAR, S. DUFOUR, C., FARBER, J. DATTA, A. TODD, E. C.D. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization e Recommendations for improved prevention and control. **Food Control**. v. 22, p. 1535-1549, 2011.

MARTINS, E. A.; GERMANO, P. M. L. *Listeria monocytogenes* in read-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo: Ocorrência, quantification and serotyping. **Food control**, v. 22, p. 297-302, 2011.

MOTTIN, V. D. **Avaliação microbiológica de apresetados, fatiados e comercializados em supermercados de Porto Alegre**. Porto Alegre: UFRS, 2008, 70f. Dissertação (Mestrado no Instituto de ciências básicas de saúde) Universidade Federal do rio Grande do Sul, 2008.

PARISI, A. LATORRE, L. FRACCALVIERI R. MICCOLUPO, A. NORMANNO, G. CARUSO, M. SANTAGADA, G. Occurrence of *Listeria* spp. in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP. **Food Control**, V. 29, p. 91-97, 2013.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. CASTRO, R. POSADA-IZQUIERDO, G. D. VALERO, A., CARRASCO, E. GARCÍA-GIMENO, R. M. ZURERA, G. Evolution of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. **Meat Science**, v. 86, p. 479-485, 2010.

RATTI, R. P. **Listeria em alimentos fatiados e equipamentos: ocorrência, formação de biofilme e controle**. Ribeirão Preto – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto 2006. p. 96. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas a Farmácia) Universidade de São Paulo, 2006.

SILVA, W. P. NALÉRIO, E. S. ARAÚJO, M. R. MENDONÇA, K. S. BASSANI, M. T. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 626-630, 2009.

APENDICE I - Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos

Projeto Mestrado Listeria - Mariana Siqueira									
Avaliação das Condições Higiênico-sanitárias dos Estabelecimentos									
Data:									
Estabelecimento:									
Denominação:							Classificação:		
Descrição								Score	
Nível de higiene dos manipuladores								0-10	
1	Utilização adequada de luvas descartáveis							0/1/2	
2	Instalações de lavagem adequada das mãos							0/1	
3	Lavagem das mãos após manipulação							0/2	
4	Utilização de utensílios para recolher fatiados							0/1	
5	Uniforme compatível com função (completo/ limpo -Avental)							0/1	
6	Higiene do manipulador (unhas limpas/cabelos protegidos/uso adornos/ uso de maquiagem)							0/1	
7	Práticas higiênicas (Tosse, espirros, canto, assobios, fumar, falar, celular)							0/1/2	
Nível de higiene dos equipamentos								0-8	
8	Alimentos pronto para consumo separados dos crus e curados							0/1	
9	Alimentos pronto para consumo mantidos em embalagens originais							0/1	
10	Maquina de fatiar exclusiva para RTE							0/2	
11	Máquina de fatias e todas as superfícies de trabalho limpas							0/1/2	
12	Cronograma de limpeza da área de fatiamento							0/1/2	
Para cada adequação pontuar.									
Classificação: (0-8) Higiene Inadequada; (9-13) Higiene aceitável; (= ou acima de 14) Higiene adequada									
Observações: _____									

